

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Klaarika Kikas

**Ühenukleotiidsete polümorfismide seos kopsuvähi riski ja  
patsientide elulemusega *mir-196a-2*, *KRAS* ja *TERT* geeni näitel**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Tarmo Annilo, PhD

Urmo Võsa, MSc

Tartu 2013

## Sisukord

Kasutatud lühendid .....	4
Sissejuhatus .....	5
1 Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1 MikroRNA .....	6
1.1.1 MikroRNA-d ja nende funktsioon .....	6
1.1.2 MikroRNA ehitus ja küpsemine .....	6
1.1.3 MiRNA-d ja ühenukleotiidsed polümorfismid.....	8
1.1.4 MiRNA-d ja vähk .....	8
1.1.5 Ühenukleotiidsed polümorfismid miRNA geenides ja vähk.....	8
1.2 RAS valk.....	10
1.2.1 RAS valgu funktsioon ja aktiivsus .....	10
1.2.2 KRAS valk.....	10
1.2.3 Mikro-RNA <i>Let-7</i> perekond ja RAS .....	11
1.3 Telomeerid .....	13
1.3.1 Telomeeride ehitus ja funktsioon .....	13
1.3.2 Telomeeride lühenemine .....	14
1.3.3 Telomeraas ja telomeeride pikenemine .....	14
1.3.4 Telomeerid, telomeraas ja vähk.....	15
2 Eksperimentaalosa .....	17
2.1 Töö eesmärk.....	17
2.2 Materjalid ja meetodid .....	18
2.2.1 Valimi kirjeldus .....	18
2.2.2 DNA eraldamine verest .....	19
2.2.3 Gelelelektroforees .....	20
2.2.4 DNA kontsentratsiooni mõõtmine ja sobiva kontsentratsioonini viimine .....	20
2.2.5 Polümeraasi ahelreaktsioon .....	20
2.2.6 PCR produktide puhastamine ja sekveneerimine .....	21

2.2.7	Genotüüpiseerimine.....	22
2.2.8	Statistiline analüüs.....	23
2.3	Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1	Tulemuste kokkuvõte .....	24
2.3.2	<i>Pre-miR-196a-2</i> polümorfism Rs11614913 .....	25
2.3.3	<i>TERT</i> geenis asuvad SNPd rs2736098 ja rs2736100.....	27
2.3.4	<i>KRAS</i> geeni let-7 seondumissaidis asuval SNP-l rs61764370 on nõrk seos kopsuvähki haigestumise riskiga.....	31
	Kokkuvõte .....	33
	Summary.....	34
	Tänuavaldused.....	35
	Kasutatud kirjandus .....	36
	Kasutatud veebiaadressid .....	45
	Lisad .....	46

## Kasutatud lühendid

EXP5 – *Exportin-5*, Eksportiin-5

GAP – *GTPase-activating protein*, GTPaasi aktiveeriv valk

GEF – *guanine nucleotide exchange factor*, guaniini nukleotiidi vahetusfaktor

HCC – *hepatocellular carcinoma*, primaarne maksarakuline vähk

LCS6 - *let-7 complementary site 6*, *let-7* komplementaarne sait 6

miRNA – *microRNA*, mikroRNA

NSCLC – *Non-small cell lung cancer*, mitte-väikerakuline kopsuvähk

Pre-miRNA – *precursor microRNA*, prekursor-mikroRNA

Pri-miRNA – *primary microRNA*, primaarne mikroRNA

RISC - *RNA-induced silencing complex*, RNA indutseeritud vaigistuskompleks

RNAi – *RNA interference*, RNA interferents

SCLC – *Small cell lung cancer*, väikerakuline kopsuvähk

siRNA – *small interfering RNA*, väike interfereeriv RNA

SNP – *single nucleotide polymorphism*, ühenukleotiidne polümorfism

TERC – *template region of RNA subunit*, telomeraasi matriits-RNA komponent

TERT – *reverse transcriptase catalytic subunit*, telomeraasi pöördtranskriptaasi subühik

## Sissejuhatus

Vähk on majanduslikult arenenud maades juhtivaks surma põhjuseks ja arengumaades teisel kohal. Tuginedes GLOBCAN 2008 andmetele, diagnoositi ühe aasta jooksul vähk 12,7 miljonil inimesel ja selle tagajärjel suri 7,6 miljonit inimest. Kõige sagedamini diagnoositakse naistel rinnavähki ja meestel kopsuvähki. Üldiselt on aga kopsuvähk kõige sagedasem surma põhjustaja erinevate vähitüüpide seas.

Vähk on multifaktoriaalne haigus, mille arengus on olulised nii geenid kui ka keskkonnamõju. Näiteks on suitsetamine kõige olulisemaks keskkonna poolseks riskifaktoriks vähi arengus. Samas on molekulaarse epidemioloogia uurimused näidanud, et vähitekk osalevad sajad geenid. Selliste geenide ja nende võimalike mõjutajate uurimine võib viia spetsiifiliste markeriteni, mille abil oleks võimalik hinnata vähki haigestumise tõenäosust, selle agressiivsust ja isegi võimalikke ravivariante.

Olulised vähitekkega seotud rakustruktuurid on telomeerid. Telomeerid, kaitsvad kordusjärjestused kromosoomi otstes, mõjutavad rakutsükli arvu ja seega määravad rakkude jagunemispotentsiaali. Telomeeride lühenedes saabub kriitiline punkt, millest rakk enam edasi ei jagune. Telomeeride pikkus omakorda on reguleeritud telomeraasi poolt. Tavaliselt on telomeraas enamikes keharakkudes inaktiivne, kuid vähirakkudes võib telomeraas olla 10 kuni 20 korda aktiivsem kui tavalistes rakkudes. Seda, millised muutused peavad esinema telomeraasis, et tekiks rakkude piiramatut jagunemist, pole suudetud veel tänaseni kindlalt määratleda.

Uuemaks leiuks vähiuuringutes on mikroRNA-de (miRNA-de) roll vähi kujunemisel ja selle kulgemisel. MiRNA-d on väikesed üheaahelised mittekodeerivad RNA-d, mis mängivad olulist rolli transkriptsiooni-järgses regulatsioonis. Need seonduvad komplementaarsuse alusel informatsiooni-RNA (mRNA) 3' mittetransleeriva järjestusega (3' UTR) ja see võib viia mRNA lagundamiseni või repressioonini ehk maha surumiseni. Mitmete vähkhaiguste korral on miRNA-de ekspressioonitase normaalsest erinev. Esimene miRNA, mida seostati kopsuvähiga, oli *let-7*, mille ekspressiooni langedes kasvas selle sihtmärgi RAS valguga ekspressioonitase. Kuna miRNA on lühike, siis võivad ka ühe nukleotiidi mutatsiooniga kaasned muutused nii ekspressioonitasemes, miRNA küpsemises kui ka seondumises sihtmärgiga.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida nelja funktsionaalse kandidaat-polümorfismi (SNP) mõju kopsuvähi kujunemise riskile ja elulemusele Eesti kopsuvähi patsientide hulgas.

# 1 Kirjanduse ülevaade

## 1.1 MikroRNA

### 1.1.1 MikroRNA-d ja nende funktsioon

MikroRNA-d (miRNA-d) on väikesed (20–25 nukleotiidi) üheaahelalised mittekodeerivad RNA-d, mis mängivad olulist rolli transkriptsiooni järgses regulatsioonis (Lagos-Quintana et al., 2001). MiRNA-d reguleerivad ligikaudu 10–30% geenide avaldumist post-transkriptsionaalsel tasemel (Lewis et al., 2005). Need seonduvad komplementaarsuse alusel informatsiooni-RNA (mRNA) 3' mittetransleeriva järjestusega (3' UTR) ja see võib viia mRNA lagundamiseni või translatsiooni repressioonini ehk maha surumiseni. Praeguseks on kinnitust leidnud miRNA-de osalus väga mitmetes bioloogilistes protsessides, näiteks metabolismis (Poy, Spranger, & Stoffel, 2007), rakkude jagunemises, diferentseerumises ja apoptoosis (Brennecke et al., 2003), organismi arengus (Lau et al., 2001) ning teistes.

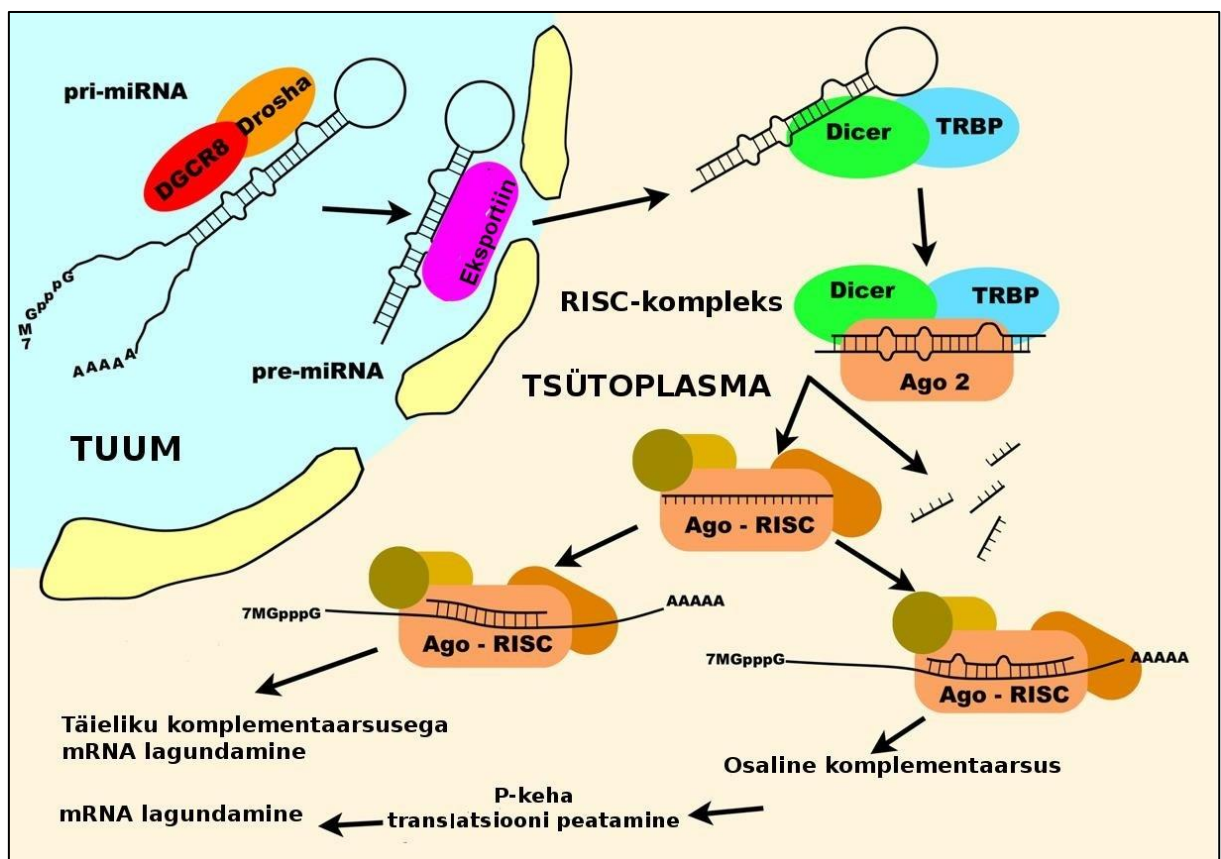
#### 1.1.1.1 RNA interferents

RNA interferentsiks (RNAi) kutsutakse mehhanismi, mille kaudu lühikesed RNA-d, nagu näiteks väike interfereeriv RNA (siRNA) ja miRNA, mõjutavad geenide avaldumist (Fire et al., 1998). Nagu ka miRNA-d, seonduvad siRNA-d RISC kompleksiga, mis koosneb mitmetest valkudest ja sisaldab nukleaasi ehk DNA-d või RNA-d lagundavat ensüümi (Hammond et al., 2000). Helikaasse aktiivsuse toimet muutub varem kaheaahelaline RNA üheaahelaliseks ning see aktiveerib RISC kompleksi (Elbashir, 2001). Nüüd saab kompleksi kuuluv üheaahelaline RNA seonduda komplementaarsuse alusel mRNA-ga. Siinkohal aga tekivad erinevused, kas tegu on siRISC (RISC kompleksiga on seotud siRNA) või miRISC kompleksiga. siRNA-d seonduvad sihtmärgiga täieliku komplementaarsuse korral ja põhjustavad mRNA lagundamise. Loomsed miRNA-d aga paarduvad enamasti osalise komplementaarsuse esinemisel ja mRNA seostumine 3' UTR-ga võib viia translatsiooni takistamiseni ja/või mRNA lagundamiseni (Chu & Rana, 2006). Küpse miRNA järjestuse nukleotiidid 2–7 moodustavad *seed* regiooni, mis paarduvad sihtmärgiga täieliku komplementaarsuse alusel ning selle piirkonnaga on määratud mRNA-de seondumise spetsiifilisus (Lai, 2002).

#### 1.1.2 MikroRNA ehitus ja küpsemine

MiRNA geenid asetsevad üle kogu genoomi, kas üksikute geenidena või sagedamini geeniklastritena (Kim & Nam, 2006). Mõningatel juhtudel paiknevad miRNA geenid valku kodeerivate geenide sees ning neid võidakse transkribeerida nii kodeeriva geeniga samalt

ahelalt kui ka vastasahelalt (Ruby, Jan, & Bartel, 2007; Kim, 2005). Joonis 1 annab skemaatilise ülevaate miRNA biogeneesist ja toimimisest. MiRNA transkriptsiooni viib läbi RNA Polümeraas II (Pol II) (Lee et al., 2004) või harvemini RNA polümeraas III (Borchert, Lanier, & Davidson, 2006). Sünteesi tulemusel tekkinud primaarsel transkriptil (pri-miRNA) on ahela 5' otsas 7-metüülguanosiini (CAP) struktuur ja 3' otsas polüA. pri-miRNA moodustab juuksenõelstruktuuri, kus ahel paardub iseendaga, moodustades nii lingusid (Lee et al., 2004). Juuksenõelstruktuur lõigatakse seejärel tuumas paikneva nukleaasi RNAas III ehk DROSHA poolt. Sealjuures on abiks RNA-d siduv valk DGCR8. (Lee et al., 2003) Lõikamise tulemusel moodustub pre-miRNA (prekursor miRNA), mis transporditakse tuumast tsütoplasmasse valgu eksportiin-5 (EXP5) abil (Yi, Qin, Macara, & Cullen, 2003). Tsütoplasmas asuv teine endonukleas RNAas III ehk DICER koos seonduva valguga TRBP viib läbi lõikamise mille tulemusel vabaneb küps miRNA (Lee et al., 2002). Küps miRNA seotakse efektorkompleksi (RISC) ja see mikroRNA-d sisaldav vaigistuskompleks (miRISC) on tööks valmis.



**Joonis 1. MikroRNA biogeneesi ülevaade loomadel.** Tuumas lõigatakse primaarset miRNA-d DROSHA poolt ja seejärel transporditakse tuumast tsütoplasmasse, kus DICER lõikab pre-miRNA-d. Seejärel küps miRNA liitub RISC kompleksiga, mille abil toimub geeni vaigistamine (Wiemer, 2007; modifitseeritud joonis).

### 1.1.3 MiRNA-d ja ühenukleotiidsed polümorfismid

Inimpopulatsioon on ligikaudu 99% ulatuses geneetiliselt identne ja seega varieerub kõigest 1% geneetilisest informatsioonist. Suure osa kogu varieeruvusest moodustavad ühenukleotiidsed polümorfismid (SNP). (The International HapMap Consortium, 2009). Inimese genoomis on identifitseeritud üle 60 miljoni SNP-i (dbSNP 137) ja need paiknevad keskmiselt iga 100–300 aluspaari järel (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Kuigi enamus SNP-e ei too endaga kaasa fenotüübilisi tagajärgi, on leitud ka selliseid varieeruvusi, millega kaasnevad inimorganismis suured muutused ja millel on roll vähi kujunemises. SNP-d võivad mõjutada ka miRNA-de funktsioneerimist. SNP-d miRNA geenides ja eriti *seed* regioonis esinevad harva ning on ilmselt negatiivse valiku all (Saunders et al., 2007; Chen & Rajewsky, 2006). SNP-d miRNA geenides võivad avaldada mõju mitmel viisil: esiteks esmase transkripti transkriptsiooni kaudu, teiseks pri-miRNA ja pre-miRNA protsessingu kaudu ja kolmandaks miRNA ja mRNA omavahelise interaktsiooni efekti kaudu. SNP-id *let-7e* ja *mir-16* primaarsetes regioonides põhjustavad küpse miRNA vähenemist (Wu et al., 2008; Calin et al., 2005). SNP rs11614913 *pre-mir-196a-2*-s mõjutab samuti miRNA biogeneesi, CC genotüübi kandjatel on küpse miR-196a-2 tase madalam kui TT kandjatel (Tian et al., 2009). Polümorfismid miRNA seondumissaitides ehk sihtmärk-geeni 3' UTR-is võivad nii luua kui hävitada seondumissaite (Ryan, Robles, & Harris, 2010).

### 1.1.4 MiRNA-d ja vähk

MikroRNA-d ekspresseeruvad koospetsiifiliselt (Lagos-Quintana et al., 2002) ja mitmete vähkhaiguste esinemisel on ekspressioonitase tavapärasest erinev. Kuna miRNA-sid on kirjeldatud osalemas rakutsükli kontrollis, siis võib oletada, et miRNA-d ja muutused nende ekspressioonis võivad olla üheks faktoriks tuumori arengus. Seda oletust toetavad tulemused, et ligikaudu 50% kõigist annoteeritud inimese miRNA geenidest asuvad kromosoomide piirkonnas, mille muutusi (deletsioonid, amplifikatsioonid ja translokatsioonid) on sageli detekteeritud vähi kujunemisel (Calin et al., 2004; Calin et al., 2002). MiRNA võib käituda nii tuumori supressorina kui ka onkogeenina, näiteks 68% kroonilise lümfotsütaarse leukeemia juhtudest oli *miR-15a* ja *miR-16-1* ekspressioon oluliselt vähenenud või täiesti alla surutud (Calin et al., 2002) ja glioblastoomi tuumorikoes avastati *miR-21* üleekspressioon (Chan, Krichevsky, & Kosik, 2005).

### 1.1.5 Ühenukleotiidsed polümorfismid miRNA geenides ja vähk

Esimene tõendus selle kohta, et punktmutatsioonid miRNA geenides omavad funktsionaalset mõju vähi kujunemises, leiti Calini ja kolleegide poolt, kes avastasid mutatsiooni *pri-mir-16-1*-s pärilikku kroonilist lümfotsütaarset leukeemiat põdevatel haigetel (Calin et al., 2005).



Selle mutatsiooni tulemuseks oli ka madal *pre-miR-16*'e ja seega ka küpse *miR-16*'e ekspressiooni tase. Kirjandusele toetudes võib väita, et funktsionaalne tagajärg SNP-i esinemisel pri-miRNA-s on seotud protsessinguga ja küpse miRNA hulgaga. Näiteks SNP-d *let-7e* primaarses järjestustes viivad vähenenud küpse miRNA tasemeni (Wu et al., 2008). Ka pre-miRNA-s esinevate SNP-dega on seostatud vähi teket. Siin võib tuua näiteks polümorfismi rs6505162, mis asub *pre-miR-423*-s. Selle SNP-ga kaasneb põievähi kõrgendatud risk (Yang et al., 2008) ja söögitoru vähi väiksem risk Euroopa päritoluga indiviidide seas (Ye et al., 2008). Veel on leitud vähiga seotud SNP-e miRNA seondumissaitides (nt. rs61764370 *KRAS* 3' UTR-is) (Nelson et al., 2010) ja miRNA-d protsessivates valkudes (nt. rs3742330 *DICER1* 3' UTR-is) (Clague et al., 2009).

#### **1.1.5.1 *miRNA-196a-2* SNP rs11614913**

Rs11614913 asub 12 kromosoomis positsioonis 54385599, *miR-196a-2* prekursor järjestuses. SNP mõju miRNA biogeneesile ilmneb selles, et küpse *miR-196a-2* tase on CC kandjatel võrreldes CT ja TT genotüüpidega indiviididega väiksem (Hu et al., 2008). Erinevates populatsioonides on SNP-i esinemise sagedused küllaltki erinevad: Euroopas C alleeli sagedus 0,56, Aasias 0,40 ja Aafrikas koguni 0,85. Juht-kontroll uuringud on andnud põhjust arvata, et pre-miRNA SNP rs11614913 C alleel suurendab riski erinevate tuumorite arenguks. Seda SNP-i on seostatud rinnavähiga (Hoffman et al., 2009), pea- ja kaelavähiga (Christensen et al., 2010), söögitoru vähiga (Ye et al., 2008), kopsuvähiga (Tian et al., 2009) ja teiste vähi tüüpidega. Ometi ei ole seosed ühesed ja samu järeldusi ei saa teha kõigi populatsioonide kohta. Kui Hiina populatsioonis seostatakse rinna- ja kopsuvähi arenemisega CC genotüüpi, siis mittedisruptiivsetest Euroopa päritoluga meeste seas on suurem vähi tekke risk just TT genotüübiga isikutel (Ryan et al., 2010). Olulisi erinevusi on leitud ka mitmetes meta-analüüsides, kus tugev seos vähiga avaldub just Aasia populatsioonis, kuid seos Euroopa populatsioonides puudub (Tian et al., 2010; Wang et al., 2012; Srivastava & Srivastava, 2012). Erinevusi on ka elulemuses, Hiina populatsioonis on kehvem elulemus seotud CC genotüübiga (Hu et al., 2008), aga USA-s läbi viidud uurimusest selgus, et TT genotüübiga patsiendid elasid keskmiselt lühema aja (Christensen et al., 2010). Seega ei ole suudetud täpselt määratleda, milliseid muutusi SNP rs11614913 endaga kaasa toob ning antud polümorfism vajab seega lähemat uurimist.

## 1.2 RAS valk

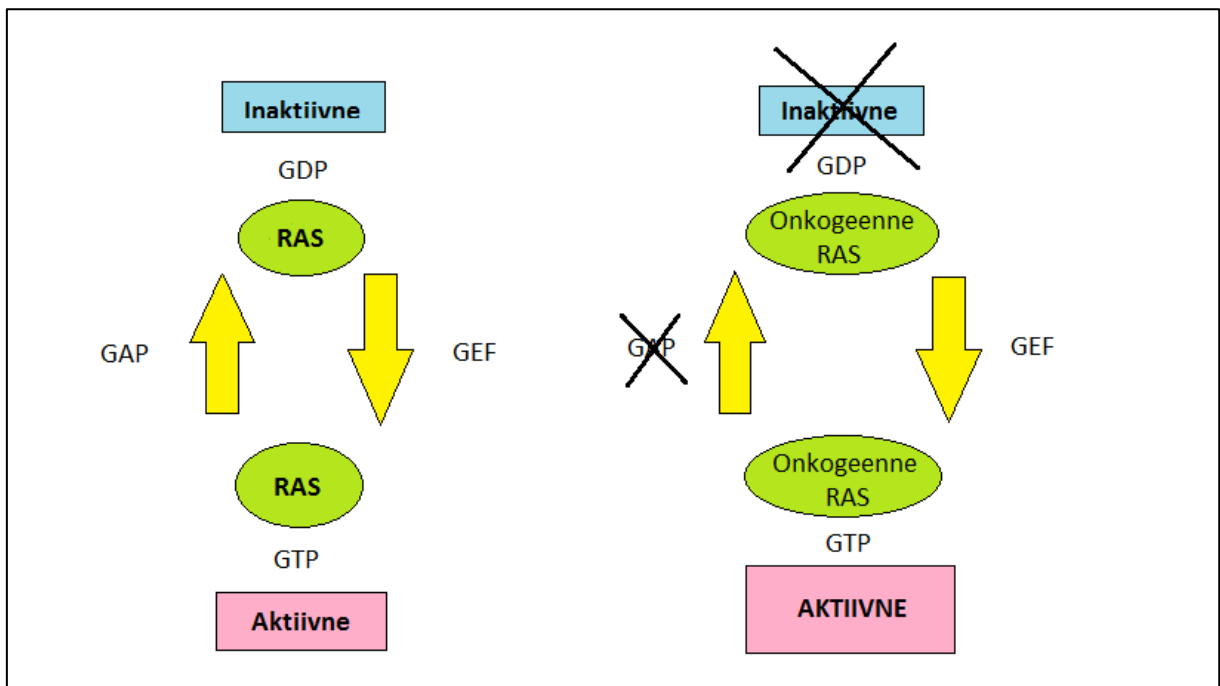
### 1.2.1 RAS valgu funktsioon ja aktiivsus

RAS on intratsellulaarne GTPaas, mis on seotud kasvusignaali kandmisega membraanilt läbi raku tuumani. RAS valkude poolt reguleeritud signaalrajad vastutavad kasvu, migratsiooni, adhesiooni, tsütoskeleti terviklikkuse, raku elu pikkuse ja diferentseerumise eest (Rajalingam et al., 2007). RAS valgud asuvad plasmamembraani intratsellulaarsel küljel ja on aktiveeritud, kui RAS on seotud GTP-ga ning inaktiivne GDP-ga seotult (Pecorino, 2008:15). GDP-le fosfaadi liitmise tulemusel toimub kahes RAS valgu regioonis struktuurne muutus. Neid piirkondi kutsutakse Switch regioon I (aminohapped 30–38) ja Switch regioon II (aminohapped 59–67) ja need moodustavad efektormolekuli seondumissaidi (Wittinghofer & Nassar, 1996). Fosfaadi eemaldamiseks on vaja GTPaasi aktiveerivat valku (GAP), mis kutsub esile GTP hüdrolyüsi. Guaniini nukleotiidi vahetusfaktor (GEF) omakorda indutseerib GDP-le fosfaadi liitmist (Joonis 2.).

RAS valgu onkogeensed mutatsioonid asuvad enamasti kolmes domeenis (G12, G13 ja Q61), mis takistavad GAP-i poolt katalüüsitud GTP hüdrolyüsi. Selle tulemusel moodustub aga pidevalt aktiivne RAS molekul, mis võib viia rakkude kontrollimatu jagunemise ja kasvamiseni. (Rajalingam et al., 2007) Ligikaudu 20% vähi juhtudest on mõni RAS perekonna geen muteerunud. Punktmutatsioonid RAS geenides esinevad 20–30% kopsu adenokartsinoomidel ja kokku võetuna 15–20% mitte-väikerakulistel kopsuvähkidel (Sekido et al., 2003).

### 1.2.2 KRAS valk

RAS perekond koosneb kolmest liikmest: HRAS, NRAS ja KRAS. HRAS-il ja NRAS-il selles töös pikemalt ei peatuta, sest edasine uurimus keskendub just KRAS-le. KRAS-il on kaks võimalikku varianti, kõrgemalt ekspresseerunud KRAS4B ja madalama ekspressiooniga KRAS4A, mis tekivad geeni alternatiivse splaissingu tulemusel (Ellis & Clark, 2000). Vähi korral on kõige enam mutatsioone leitud KRAS-i koodonites 12, 13 ja 61. Ligikaudu 70% KRAS-i mutatsioonidest on G-T transversioonid, mille tulemusena aminohape glütsiin (GGT) asendatakse tsüsteiini (TGT) või valiiniga (GTT). (Sekido et al., 2003)



**Joonis 2. RAS valgu “lüli” süsteem.** Joonise vasakpoolses osas on kujutatud normaalne olukord, kus RAS valk saab olla nii aktiivses kui inaktiivses olekus. Parempoolsel joonisel on kujutatud muteerunud RAS valku, mille tulemusel on takistatud GAP vahendatud GTP hüdroolüüs ja selle tulemusel on RAS pidevalt aktiivses seisundis. Joonis on koostatud Duursma ja Agami 2003. aasta artikli järgi (Duursma & Agami, 2003).

### 1.2.3 Mikro-RNA *Let-7* perekond ja RAS

*Lethal-7 (let-7)* perekonda kuuluvate miRNA-de järjestused on peaaegu identsed ja omavad osaliselt konserveerunud järjestust küpse miRNA 5' otstes. Selle tõttu käsitletakse edaspidi lihtsustamiseks *let-7*-t ainsuses. *Let-7*, üks esimesena avastatud miRNA-dest, on vastutav raku surma ajastamise eest *C. elegans*is. Muteerumata loomadel esineb ajutine *let-7* miRNA üles regulatsioon tüvirakkudes, mis on vajalik rakkude diferentseerumiseks (Reinhart et al., 2000). *Let-7* mutantide korral ei välju tüvirakud rakutsüklist ega diferentseeru õigel ajal, vaid hoopis paljunevad, luues nii eelduse vähi arenguks. Kõigil kolmel *RAS* geenil (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS*) on *let-7* komplementaarne potentsiaalne seundumissait nende 3' UTR-is, mis viitab *let-7* vahendatud regulatsioonile (Johnson et al., 2005). Kopsutuumori koes on võrreldes normaalse kopsu koega oluliselt vähenenud *let-7* tase ja märgatavalt suurenenud RAS valgu tase. Seondudes *KRAS* mRNA 3' UTRiga, surub *let-7* maha selle ekspressiooni. (Johnson et al., 2005) Vähenenud *let-7* ekspressiooniga on seotud ka kehvem prognoos elulemusele (Nelson et al., 1999; Takamizawa et al., 2004).

### 1.2.3.1 *KRAS-i polümorfism LCS6 (rs61764370)*

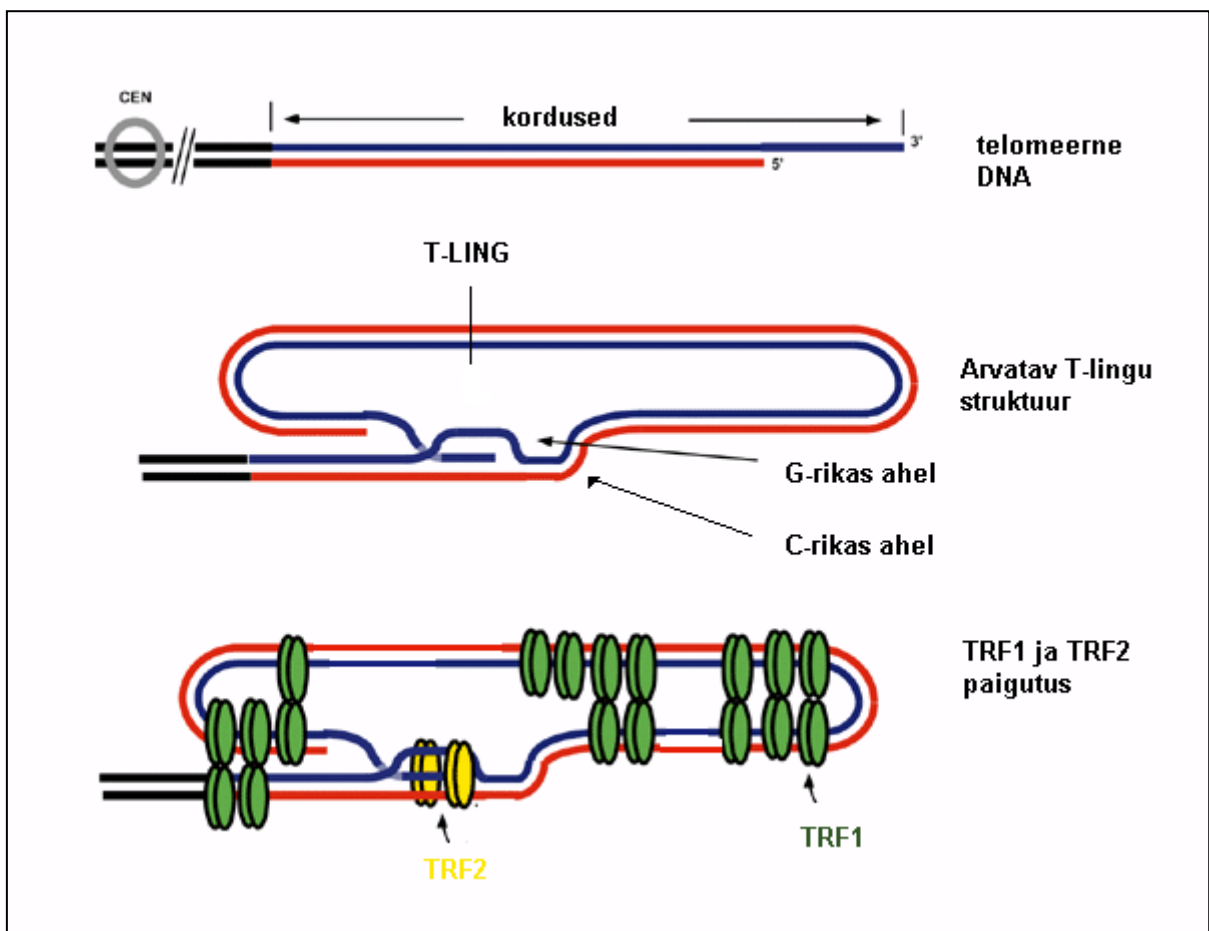
2008. aastal avastasid Chini ja tema kolleegid uue SNP-i, mis asub *KRAS* geeni 3' UTR-is ning takistab *let-7* seondumist (Chin et al., 2008). Selle tulemusel on *KRAS* üleekspressioneeritud ja *let-7* hulk on vähenenud. SNP-i rs61764370 on seostatud eelkõige kopsuvähiga, kuid on leitud seoseid ka rinnavähiga (Cerne et al., 2012) ja munasarja vähiga (Ratner et al., 2011). Kuid ka siin ei ole seosed veel kuigi selged, sest esineb ka eelmainitud töödele vastukäivaid tulemusi. Näiteks ei õnnestunud Nelsonil ja tema kollegidel tõestada minoorse alleeliga NSCLC patsientide kehvemat prognoosi elulemusele (Nelson et al., 2010).

SNP-ga rs61764370 kaasneb tümiini asendumine guaniiniga seondumissaidi neljandas positsioonis. LCS6 (*let-7* complementary site 6) polümorfism on küllaltki haruldane, G alleeli sagedus on keskmiselt 6%. Euroopa populatsioonis on sagedus kõrgem (7,6%), kuid Aasia kesk-ja idaosas on see kõigest ligikaudu 0,3% (Chin et al., 2008b). Täpsemad andmed alleelisageduste kohta on lisas joonisel nr. 14.

## 1.3 Telomeerid

### 1.3.1 Telomeeride ehitus ja funktsioon

Telomeerid on piirkonnad kromosoomi otstes, mis koosnevad mitmest tuhandest kõrvutiasetsevast TTAGGG (inimesel) järjestusest (Moyzis et al., 1988). Nende järjestustega on seotud valkkompleks, mida kutsutakse *shelterin* kompleksiks (De Lange, 2005). See kompleks takistab kromosoomi otste omavahelist kinni jäämist ja lagundamist, moodustades kromosoomi otsa spetsiaalsed T-ling struktuurid (De Lange, 2004). T-ling (joonis 3) struktuur takistab ka DNA reparatsiooni mehhanismidel kromosoomi otsi tõlgendamast kui ahela katkeid (Shay, 2003). Telomeeri G-rikka ahela 3' otsas on 100-200 nukleotiidi pikkune üheaahelaline regioon. Need nukleotiidid tungivad telomeeri otsa tagasikeerdumisel kaksikahela vahele ja moodustub nn tripletne piirkond, mida kutsutakse ka D-linguks. Moodustunud struktuuri stabiliseerivad mitmed valgud. (De Lange, 2004)



**Joonis 3. Telomeeri otsa ehitus.** Telomeeri ots on tagasi keerdunud, moodustades T-lingu, sealjuures on üksikahelaline DNA ots seotud kaheaahelalise järjestusega. Struktuuri stabiliseerivad mitmed valgud, näiteks TRF1 ja TRF2.

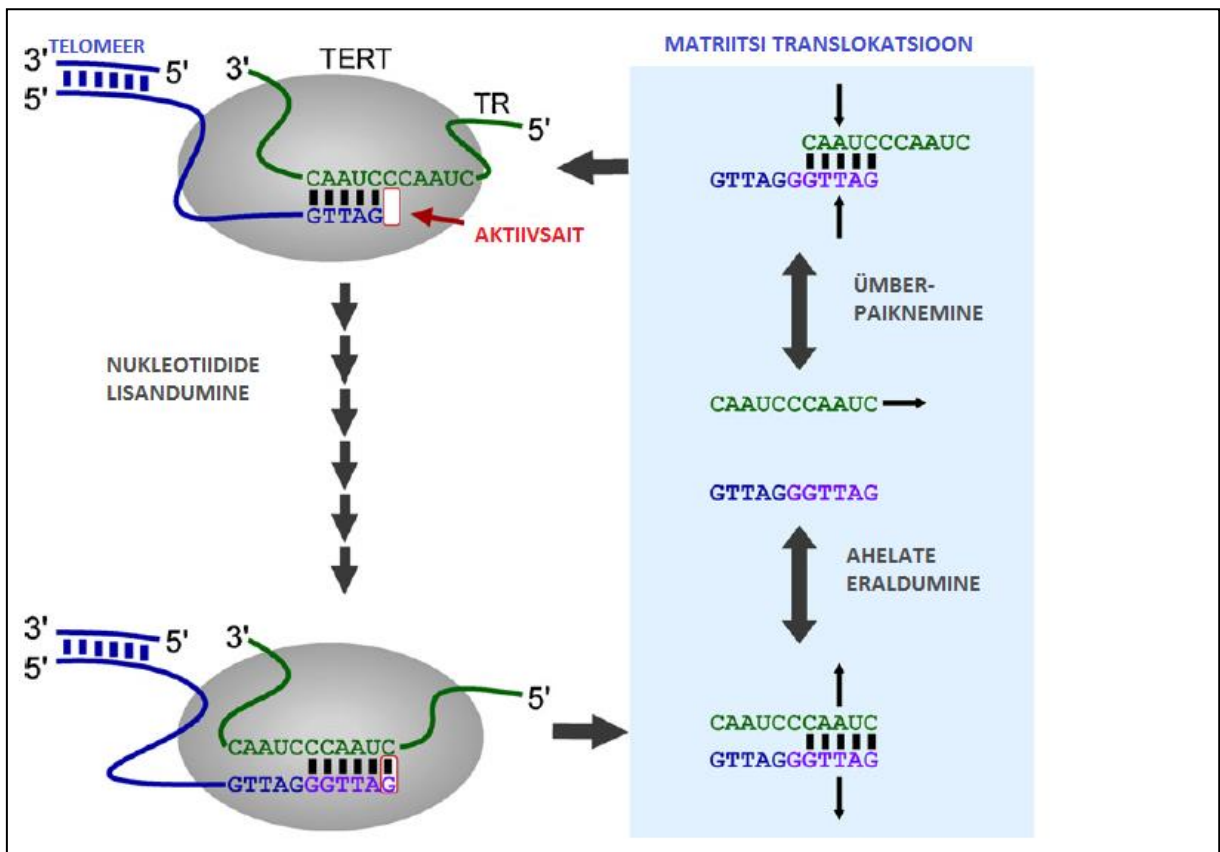
### 1.3.2 Telomeeride lühenemine

Telomeeride lühenemisega on määratud ka rakkude jagunemisvõime (Verdun & Karlseder, 2007). Iga raku jagunemisega kaotavad telomeerid oma pikkusest 100-200 aluspaari (Shay & Wright, 2000). Esineb kolm peamist põhjust, miks telomeerid lühenevad. Esiteks lineaarse DNA replikatsioon ei ole täielik, sellisel juhul lüheneb DNA ahel replikatsiooni algatavate praimerite pikkuste võrra (Olovnikov, 1973). Teiseks töötleb endonukleaaas 5' otsa (Makarov, Hirose, & Langmore, 1997) ja kolmandaks jääb parandamata oksüdatiivne kahjustus (Von Zglinicki, 2002). Kui telomeerid on lühenenud kriitilise punktini, siis raku jagunemine peatub (Jerry W Shay, 2003). Rakud, mis jätkavad jagunemist, kaotavad oma kaitsva telomeerse DNA ja sisenevad faasi, mida kutsutakse kriisiks. Selles faasis tekib suur genoomne ebastabiilsus, mis lõpuks tingib raku surma (Seger et al., 2002).

### 1.3.3 Telomeraas ja telomeeride pikenemine

Telomeraas on valk, mille ülesandeks on telomeeride pikendamine pöördtranskriptsiooni teel ehk RNA-lt sünteesitakse DNA (Greider & Blackburn 1989; Yu et al. 1990). Telomeraasi kaheks peamiseks komponendiks on pöördtranskriptaasi katalüütiline subühik (hTERT) ja matriits RNA (hTERC või ka TR) (Lingner, 1997). *hTERC* sisaldab järjestust 5'-CAAUCCCAAUC- 3', mis on komplementaarne kromosoomi otstes olevate TTAGGG järjestustega (Nugent & Lundblad, 1998).

Telomeraasi reaktsiooni võib jagada ahela sünteesiks, mida viib läbi TERT, ja matriitsi (TERC) ümberpaiknemiseks. Telomeeri pikendamine algab, kui selle üheahelalise otsaga paardub nelja nukleotiidi ulatuses TERC. Telomeeri lõppjärjestus käitub praimerina ja TERT sünteesib ahela kuni matriitsi lõpuni, inimesel on see 6 nukleotiidi. Seejärel toimub kas uueks sünteesiks ümberpaiknemine või telomeraasi täielik eemaldumine. Seda protsessi on kujutatud ka joonisel 4.



**Joonis 4. Inimese telomeeride pikenemise mudel.** Joonise vasakpoolses osas on kujutatud nukleotiidide lisandumist ja paremal pool sinises kastis matriitsi translokatsiooni. Siin on tähistatud halliga hTERT, TERC on roheline, DNA praimer sinine ja violetsega on tähistatud lisandunud nukleotiidid (Podlevsky et al., 2012; modifitseeritud joonis)

#### 1.3.4 Telomeerid, telomeraas ja vähk

Enamikus rakkudes on telomeraas praktiliselt inaktiivne ja rakud omavad piiratud jagunemisvõimet. Telomeraasi aktiivsusega on seostatud vähi teket ja kulgu ning selle aktiivsust on detekteeritud ligikaudu 90% kasvajates (Shay & Wright, 2011). Sageli kaasneb telomeraasi normaalsest kõrgema aktiivsusega ka haiguse halvem prognoos (Langford et al., 1997). Kui tavaliselt telomeerid rakkudes lühenevad, lõpetavad rakud jagunemise ja mõne aja möödudes ka surevad. Võib juhtuda, et mõnel rakul õnnestub kriisist pääseda, sest nende telomeraas on üles reguleeritud või taasaktiveerub (Shay & Bacchetti, 1997). Kui telomeraas pole siiski piisavalt aktiivne, ei suuda rakud jaguneda piisavalt palju, et tekiks pahaloomuline kasvaja. Teisel juhul on telomeraas tugevalt üleekspressseerunud ja telomeerid pikenevad kiiresti. Sellist olukorda on primaarsetel vähirakkudel täheldatud harva, ligikaudu 10% juhtudest. Kõige sagedamini on vähirakkudel leitud hoopis minimaalse pikkusega telomeere, mille korral on rakk kaitstud DNA kahjustuse ja selletõttu jagunemise peatumise eest. (Shay & Wright, 2011)

Kuna telomeerid ja telomeraasi aktiivsus on vähi arengus olulisel kohal, siis mutatsioonid telomeraasi geenides võivad osutada olulisteks teguriteks tuumori arengus. Näiteks hTERT geenis asuvat SNP-I rs2075786 on seostatud Lynchi sündroomiga, mille tõttu võib patsiendil areneda tuumoreid juba noores eas. AA genotüübiga patsientidel olid lühemad telomeerid ja suurem risk tuumori arenguks kui GG genotüüpi kandvatel (Bellido et al., 2012).

#### **1.3.4.1 Rs2736098 ja rs2736100**

SNP rs2736098 on transitsioon, kus guaniini asemel võib olla adeniin. Polümorfism asub hTERT geenis viiendas kromosoomis. HapMapi andmetel on A alleeli sagedus Euroopas 0,37, Aasias 0,41 ja Kesk-Aafrikas kõigest 0,05. Seda SNP-i on seostatud primaarse maksarakulise vähiga (hepatocellular carcinoma ehk HCC). Zhang koos kolleegidega leidis, et patsientidel oli võrreldes kontrollidega väiksem GG genotüübi sagedus (33,3% vs 44,3%) (Zhang et al., 2013). Ka meta-analüüsid vihjavad, et see polümorfism võib olla seotud suurenenud vähi haigestumise riskiga ja seda eriti Aasia populatsioonis (Zhang et al., 2012; Qi et al., 2012). Ometi ei ole seos vähi ja rs2736098 vahel veel kindel, sest leidub ka uurimusi, mis seda ümber lükkavad. Pärasoolevähi ja antud polümorfismi vahelist seost Euroopa populatsioonis ei ole uurimustes välja tulnud (Hofer et al., 2012) ning ka Qi ja kolleegide 2012. aastal läbi viidud meta-analüüs ei kinnitanud üldist seost SNP-i ja vähi vahel (Qi et al., 2012).

Rs2736100 korral on tegu transversiooniga, mille käigus tümiin võib olla asendunud guaniiniga. See SNP asub samuti *hTERT* geenis viiendas kromosoomis ning selle polümorfismi G alleeli sagedused ei ole populatsiooniti kuigi erinevad: Euroopas 0,527; Aasias 0,407 ja Kesk-Aafrikas 0,388. SNP-i rs2736100 on seostatud kopsuvähi ja pikemate telomeeridega. Hiina mittesuitsetajatest naiste seas täheldati G alleeli kandjatel pikemaid telomeere ning ka patsientide ja kontrollide võrdluses leiti, et G alleeli esines rohkem patsientidel (Lan et al., 2013). SNP-ga on seostatud pärasoole vähi kujunemise tõenäosust (Kinnarsley et al., 2012) ning ka meta-analüüs on näidanud seost vähi ja rs2736100 vahel (Zou et al., 2012).



## 2 Eksperimentaalosa

### 2.1 Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida nelja kandidaat-polümorfismi (SNP) mõju kopsuvähi kujunemise riskile ja elulemusele Eesti kopsuvähi patsientide hulgas.

Kaks miRNAdega seotud SNPd (rs11614913 ja rs61764370) valiti tuginedes nende funktsionaalsele rollile miRNAde poolt vahendatud regulatsioonimehhanismides, SNP-d *TERT* geenis (rs2736098 ja rs2736100) valiti tuginedes nende potentsiaalsele seosele kopsuvähi riskiga mittesuitsetajatel (Pauline Ng, personaalne kommunikatsioon).

Võimalike seoste avastamiseks konstrueeriti juht-kontroll uurimus, kus võrreldi 211 patsiendi ja 408 kontrollindiviidi genotüüpe. Elulemuse uurimiseks analüüsiti patsientide operatsiooni järgset elu pikkust.

## 2.2 Materjalid ja meetodid

### 2.2.1 Valimi kirjeldus

Töö läbiviimiseks saadi materjali kahest allikast. Esiteks kasutati dr. Tõnu Vooderi poolt kahe uuringu raames (I uuring 2002-2006, II uuring 2007-2009) TÜ Kliinikumi kopsukliinikus kogutud mitte-väikerakulise kopsuvähi patsientide vereproove. Esimene uuring hõlmas 143 patsienti ja teine uuring 54 patsienti.

**Tabel 1. Valimi kirjeldus.** Lõpliku valimi koostamisel eemaldati kopsukliinikus kogutud proovide hulgast patsiendid, kelle puhul lõplikuks diagnoosiks ei olnud mitte-väikerakuline kopsuvähk. Samuti jäeti välja ka madala kvaliteedi ning kontsentratsiooniga DNA proovid. Geenivaramu kaudu saadud proovide kirjeldus oli kahjuks ebapiisav, et määrata tuumori subtüüp.

		Tuumor	Kontoll
Proovide arv		211	408
Sugu	Mees	170 (80,6%)	314 (80,0%)
	Naine	41	94
Vanus		64 (36–86)	64 (29–84)
Suitsetamine	Ei	30 (14,2%)	68 (16,7%)
	Jah	181	340
Tuumori tüüp	Adenokartsinoom	38	
	Epidermoidne vähk	87	
	Bronhioloalveolaarne vähk	22	

Uuringuks oli olemas TÜ eetikakomitee luba ning kõik uuritavad allkirjastasid informeeritud nõusoleku vormi. Kõigi patsientide kohta on kogutud ka elulemuse andmed 2012. aasta jaanuari seisuga. Teiseks allikaks olid DNA proovid Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramust. Patsientide gruppi (N=58) valiti indiviidid, kellel geenidoonoriks hakkamise ajal oli diagnoositud kopsuvähk (ICD-10 C34). Kontroll-indiviidide gruppi (N=408) valiti geenidoonorid, kes kattusid vanuse, soo ja suitsetamise staatuse poolest patsientidega, kuid kellel ei olnud diagnoositud ühtegi kasvajat ja kes ei olnud omavahel lähisugulased.

### 2.2.2 DNA eraldamine verest

I uuringu raames kogutud vereproovidest oli DNA eelnevalt eraldatud. II uuringu raames kogutud vereproovidest eraldati DNA kasutades väljasoolamismeetodit (Lahiri & Nurnberger, 1991). Protokoll, mille järgi DNA eraldamine toimus, oli järgmine:

1. 4 ml verd panna 15 ml tuubi
2. Lisada 8 ml lüüsipuhvrit A, raputada
3. Asetada jääle 30 minutiks
4. Fuugida 3100 pöörde juures 10 minutit
5. Valada supernatant ettevaatlikult ära ja valada peale 8 ml lüüsipuhvrit A
6. Fuugida 3100 pöörde juures 10 minutit
7. Valada supernatant ära ja lisada 1,6 ml soolapuhvrit TKM1. Korraks raputada ja lisada kohe 100 µl ISEL-CA-630 (Sigma), raputada, et tekiks ühtlane mass
8. Asetada tuub -20°C juurde üle öö seisma (võib seista ka kauem)
9. Sulatada aeglaselt
10. Fuugida 3100 pöörde juures 10 minutit
11. Valada supernatant pealt ära ja lisada 1,6 ml soolalahust TKM2, suspendeerida
12. Lisada 80 µl SDS 10% ja siis 0,8 ml TKM2, suspendeerida ühtlaseks
13. Tuub asetada 56°C juurde termostaati 20 minutiks
14. Lisada kiiresti 0,8 ml 5 M NaCl lahust, pipeteerida kuni tekib ühtlane mass
15. Fuugida 3100 pöörde juures 10 minutit

16. Võtta supernatant ja lisada see 15 ml 96% külma (-20°C kapist) etanooli
17. Tekkinud klomp keerutada klaaspulga (Pasteuri pipetist tehtud) ümber ning kasta korraks 70% etanooli (0,5 ml)
18. Pulk asetada kuivama
19. Murda ära DNA-ga pulga osa ja panna 0,5 ml TE'sse lahustuma
20. Paremaks lahustumiseks asetada üleöö rootorile
21. Proov eemaldada klaasikildude seast ja tõsta uude 1,5 ml tuubi

Kasutatud lahuste (A-lüüsipuhver, TKM1 ja TKM2) koostised on kirjas lisas.

### 2.2.3 Geelelektroforees

DNA kvaliteedi hindamiseks viidi läbi geelelektroforees 0,8% agarosgeelis 0,5 x TBE puhvris. Selleks segati kõigepealt 1 µl DNA-d, 4 µl vett ja 1 µl laadimispuhvit (Fermentase 6 x Loading Dye) ning proov kanti geeli hambasse. Geelile kanti ka firma Fermentas DNA suurusmarker. Elektroforees toimus pingel 120-150 volti. Seejärel visualiseeriti DNA pildistades geeli UV valguses.

### 2.2.4 DNA kontsentratsiooni mõõtmine ja sobiva kontsentratsioonini viimine

Kontsentratsioon mõõdeti Nanodrop ND-1000 abil. Proovide soovitavaks kontsentratsiooniks valiti 20 ng/µl. Seega kõrgema kontsentratsiooniga proovid lahjendati lisades TE-d ja madalama DNA sisaldusega proovid esmalt kontsentreeriti kasutades vaakumkontsentraatorit Christ CT 02-50 ja siis lahjendati soovitud kontsentratsioonini.

### 2.2.5 Polümeraasi ahelreaktsioon

Kuna SNPd rs61764370 paikneb kordusjärjestusi sisaldavas piirkonnas, paljundati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil seda polümorfismi sisaldav genoomne fragment erinevate genotüüpidega indiviididel, et hiljem sekveneerimise abil kontrollida genotüpiseerimise tulemusi. PCRi praimerid disainiti väljaspoole kordusjärjestusi, et nad paljundaksid kindlasti genoomist ainult unikaalse fragmendi.

Valmistati PCR segu ühe proovi kohta (lõppkontsentratsioonides)

1. 10 x puhver B 2 µl (Solis BioDyne)
2. dNTP segu 5 mM
3. MgCl<sub>2</sub> 50 mM

4. H<sub>2</sub>O 11,5 µl
5. Praimerid (forward ja reverse) 10 pmol
6. DNA 10 mg
7. Taq DNA Polümeraas ~ 0,85 U (Thermo Scientific)

Kasutatavate praimerite järjestused olid

Rs11614913 jaoks 5'- GGGCTGAATTTCTTCCTTCC -3' *forward* praimer ning 5'- GCATAAAGCAGGGTTCTCCA -3' *reverse* praimer.

Rs61764370 jaoks 5'- GCCAGGCTGGTCTCGAA -3' *forward* praimer ning 5'- CTGAATAAATGAGTTCTGCAAAACAGGTT -3' *reverse* praimer (sekveneerimise pildid lisas, joonis 15).

PCR viidi läbi nelja plokina. Esiteks eelkuumutati proove 15 minutit 94°C juures. Teises plokis denatureeriti DNA ahelad 20 sekundi jooksul 94°C juures. Pärast seda hoiti proove 20 sekundit temperatuuril 62–57°C juures, sealjuures igas tsükli korduses temperatuur vähenes 0,5°C. Seejärel toimus 72°C juures 30 sekundi jooksul DNA süntees. Neid kolme etappi korrati 10 korda. Kolmandas plokis toimus kõik samamoodi nagu esimeses, kuid praimerite seondumise temperatuur enam ei muutunud ja püsis 57°C juures. Kolmandat plokki korrati 25 korda. Pärast tsüklite lõppu hoiti proove veel 5 minutit 72°C juures, et kõik pooleli olevad fragmendid lõpuni sünteesitaks ning seejärel langetati proovide temperatuur paremaks säilimiseks 4°C juurde.

#### 2.2.6 PCR produktide puhastamine ja sekveneerimine

PCR proovid sekveneeriti Sangeri meetodit kasutades. Esmalt valmistati ensüümide Exo I (20 U/ml) ja aluselise fosfataasi (SAP) (1 U/ml) segu koostisega 0,5 osa Exo I ja 9,5 osa SAP. 5 µl PCR proovidele lisati 1,2 µl ensüümide segu, et vältida praimerite segavat mõju sekveneerimise tulemusele. Proove inkubeeriti 37°C juures 20 minutit ja reaktsioon peatati ensüümide inaktiveerimisega, hoides 15 minuti vältel temperatuuril 80°C. Seejärel proov jahutati 10°C juurde.

Sekveneerimisreaktsiooniks valmistati proovid firma Applied Biosystems'i BigDye Terminator v.3.1 sekveneerimiskomplekti abil ning kasutati tootjafirma protokoll. Vastavalt protokollile segati kokku 10 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas 2 µl 5 x lahjenduspuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl<sub>2</sub>); 10 pmol praimerit; 0,7 µl 2,5x premix'i (Big Dye PR-100 mix v3.1); 1 µl sekveneeritavat PCR-i produkti ja 5,3 µl vett. Reaktsioon viidi läbi

termotsükleris, kus denaturatsioon toimus 20 sekundi jooksul 95°C juures, praimerite seondumine 50°C juures 15 sekundi jooksul ja ekstensioon 60°C juures ühe minuti vältel.

Sadestamiseks lisati proovi kohta 2 µl ammooniumatsetaadi ja dekstraani (10 mg/ml) segu ja 30 µl 96% etanooli, mis oli viidud temperatuurini -20°C. Sade fuugiti põhja 16060 g juures 15 minuti vältel. Seejärel pesti sadet 75% etanooliga ja lasti kuivada. Sade lahustati üles 70% formamiidis.

Kasutati TŮMRI sekveneermisteenust ja DNA sekveneeriti ABI Prism™3730xl kapillaarsekvenaatoriga. Saadud tulemusi vaadeldi programmi BioEdit abil.

### 2.2.7 Genotüpiseerimine

Edasise analüüsi teostamiseks tuli kindlaks määrata nii patsientide kui kontrollvalimi indiviidide genotüübid. Enne genotüpiseerimist eemaldati valimist proovid, mille DNA kvaliteet oli halb või DNA kontsentratsioon liiga väike (alla 20 ng/µl). Üle vaadati ka patsientide diagnoosid, et sealt eemaldada valimisse sobimatud. Kokku eemaldati valimist 40 proovi: 14 DNA madala kvaliteedi ja kontsentratsiooni ning 26 ebasobiva diagnoosi tõttu. Valimist eemaldati patsientide proovid diagnoosiga suurerakuline vähk, maligne kartsinoid, tuberkuloos, fibroos, pneumoonia, anaplastiline vähk, benigne kartsinoid ja kaerarakuline vähk.

miRNA-196a-2 SNP rs11614913, miRNA *let-7* polümorfismi KRAS-LCS6, *TERT* geeni SNP-de rs2736098 ja rs2736100 genotüpiseerimiseks kasutati firma Applied Biosystems TaqMan SNP genotüpiseerimise süsteemi. Reaktsiooni segu valmistati TaqMani genotüpiseerimise protokoll järgi. Selle kohaselt tuli ühe proovi 384 positsiooniga plaadile kandmise korral kogumahuks 5 µl, millest 2,5 µl oli 2 x Master Mix (Fermentase Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix), 0,25 µl moodustas 20 x TaqMani SNP genotüpiseerimise töölahus ja 2,25 µl DNA proov. Sealjuures DNA proovi kontsentratsioon peaks soovituslikult jääma vahemikku 1–20 ng. Kasutades DNA proovi kontsentratsiooniga 20 ng/µl kujunes DNA lõppkontsentratsiooniks proovis 9 ng. Tänu spetsiifiliselt fluorestseeruvatele märgistele (VIC ja FAM) oli võimalik määrata, milline nukleotiid uuritava SNP kohal asus. Plaadil kokku segatud proovid asetati ettevõtte Applied Biosystems aparaati 7900HT Fast Real-Time PCR System ja käivitati programm SDS 2.4 (Applied Biosystems) abil. Esmalt mõõtis aparaat esmase fluorestsentsi ning seejärel käivitati PCR. Selleks kuumutati proove vastavalt TaqMan SNP genotüpiseerimise protokollile 10 minutit 95°C juures, et aktiveeruks spetsiaalne polümeraas AmpliTaq Gold, millel on 5'-3' nukleasne aktiivsus, tänu millele on võimalik vabastada fluorestseeruv märgis. Edasi toimus ahelate denatureerimine 92°C juures 15 sekundi jooksul ja seejärel ühe minuti jooksul DNA ahelate süntees 60°C juures.

Denaturatsiooni ja sünteesi etappe korrati 40 korda. Pärast sünteesi lõppu mõõtis masin fluorestsentsi, mis määras nukleotiidi kindlas ahela positsioonis, igas plaadi augus. Tulemusi vaadeldi programmi SDS 2.4 abil.

#### 2.2.8 Statistiline analüüs

Selleks, et hinnata, kas erinevad ühenukleotiidsed polümorfismid mõjutavad vähi kujunemist konstrueeriti juht-kontroll uurimus 211 patsiendi ja 408 kontrolli seas. Genotüpiseerimise abil saadi andmed erinevate genotüüpide esinemissageduste kohta nii patsientide kui kontrolli grupis. Esmalt hinnati gruppide võimet esindada kogu populatsiooni Hardy-Weinbergi võrrandist lähtudes. Selleks, et hinnata, kas teatud genotüübi või alleeli kandajatel on suurem risk vähi tekkeks hinnati assotsiatsiooni olulisust Pearsoni tüüpi hii-ruut ( $\chi^2$ ) testiga ja arvutati homogeensusest hälbumise hindamiseks riskide suhe (odds ratio ehk OR). Nende analüüside läbiviimiseks kasutati Microsoft Excelit ja veebipõhist kalkulaatorit aadressil <http://vassarstats.net/>.

Elulemuse hindamiseks kasutati statistikatarkvara R 2.15.2 koos lisapaketiga survival. Selle programmi abil järjestati ja sorteeriti patsientide operatsioonijärgne elu pikkus seostatult genotüüpidega. Erinevate genotüüpidega patsiendigruppide elulemused visualiseeriti Kaplan-Meieri elulemusgraafikute abil ja nendevahelist erinevust analüüsiti log-rank testi abil. Kuna Geenivaramust saadud patsientide andmetes ei kajastunud elulemuse andmed, tuli need analüüsist välja jätta ja uuritavate proovide arv jäi 158 piiresse (mõnede SNP-de puhul arv veidi väiksem, sest genotüpiseerimise signaal oli nõrk või ebatäpne).

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1 Tulemuste kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli analüüsida nelja SNP seost kopsuvähi tekke ja kliinilise kuluga Eesti patsientidel. Selleks genotüpiseerisin vastavad polümorfismid kasutades TaqMan süsteemi. Kõikide polümorfismide korral oli kontrollpopulatsioon Hardy-Weinbergi tasakaalus, oodatavate ja vaadeldud sageduste hii-ruut testi P-väärtus oli märkimisväärselt suurem 0,05-st. Kontrollgrupp valiti nii, et välistada soo, vanuse, suitsetamise ja muude kasvajate võimalik mõju analüüsi tulemustele. Nii kontrollide kui ka patsientide gruppis olid sugude sagedused väga sarnased, kontrollide seas oli mehi 80,0% ja patsientide seas 80,6%. Ka vanus oli püütud võimalike mõjutajatena kõrvale jätta, mõlema grupi keskmine vanus on 64 aastat. Suitsetamise mõju vähendamiseks sorteeriti esmalt patsiendid mittersuitsetajateks ja suitsetajateks, viimane grupp omakorda viieks alagrupiks pakkaastate alusel. Selle jaotuse alusel püüti kontrollgrupp valida võimalikult sarnane patsientidele (vaata ka table 1). Elulemusanalüüsis vaadeldi vaid vähihaigete patsientide andmeid (puuduvate elulemusandmete tõttu jäeti välja Geenivaramu doonorite andmed).

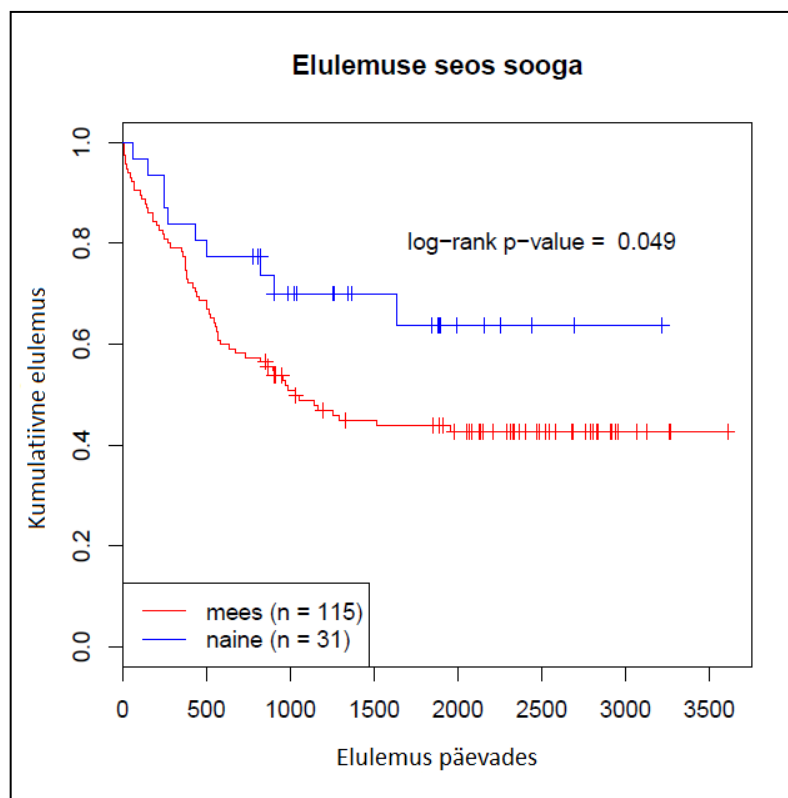
**Tabel 2. Nelja kandidaat-SNP-i genotüüpide ja alleelide sagedused, riskide suhted koos 95% usaldusintervallidega ja hii-ruut testi p-väärtused.** Ainus SNP, mis viitab, et kujunenud genotüüpide ja alleelide sagedused ei ole juhuslikud, on rs61764370.

		Patsiendid (%)	Kontrollid (%)	$\chi^2$ testi p-väärtus	OR (95%)
Rs11614913	CC (vs. CT ja TT)	34,3	38,4	0,36	1,17 (0,83–1,63)
	TT (vs. CT ja CC)	13,6	17,3	0,60	1,34 (0,85–2,10)
	C (vs. T)	60,5	60,6	0,98	0,99 (0,79–1,26)
Rs2736098	CC (vs. CT ja TT)	62,7	57,8	0,22	0,81 (0,59–1,13)
	TT (vs. CT ja CC)	-	-	-	-
	C (vs. T)	79,4	76,7	0,25	0,85 (0,64–1,12)
Rs2736100	AA (vs. AC ja CC)	30,7	27,6	0,25	0,86 (0,60–1,22)
	CC (vs. AC ja AA)	19,7	23,1	0,33	1,22 (0,82–1,81)
	A (vs. C)	55,5	52,3	0,27	0,88 (0,70–1,10)
Rs61764370	TT (vs. GT ja GG)	92,5	87,3	0,04	0,56 (0,32 – 0,98)
	GG (vs. GT ja TT)	-	-	-	-
	G (vs. T)	3,7	6,6	0,03	1,81 (1,05–3,16)



Lisaks sellele, et rs6176370 polümorfismi G alleelil võib olla kaitsev mõju kopsuvähki haigestumise vastu, selgus, et SNP rs11614913 T alleeli kandajatel on parem prognoos elulemusele. Teised polümorfismid ei omanud statistiliselt olulist seost elulemusega.

Huvitaval kombel viitab P-väärtus, aga seosele soo ja elulemuse vahel, kuid samas on naiste hulk valimis oluliselt väiksem kui meeste arv ja seega suuremas valimis seost ei pruugi esineda ning tegu võib olla kõrvalekaldega.



**Joonis 5. Elulemuse seos sooga.** Naiste (sinine) operatsioonijärgne elulemus oli meeste (punane) omast parem.

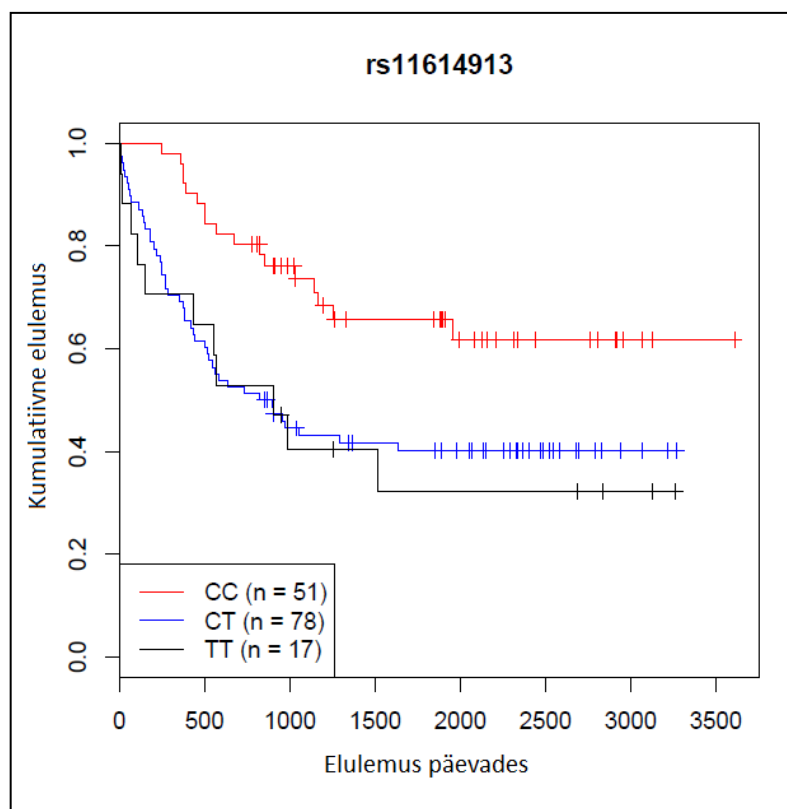
### 2.3.2 *Pre-miR-196a-2* polümorfism rs11614913

Mikro-RNA 196a-2 prekursor järjestuses esinev polümorfismi rs11614913 CC genotüübiga indiviididel on täheldatud küpse miRNA madalamat taset. Selline muutus võib omakorda omada mõju vähi kujunemisele ja arengule ning vajab ka varasematest uurimustest selgunud tulemuste vastukäivuse tõttu edasist uurimist.

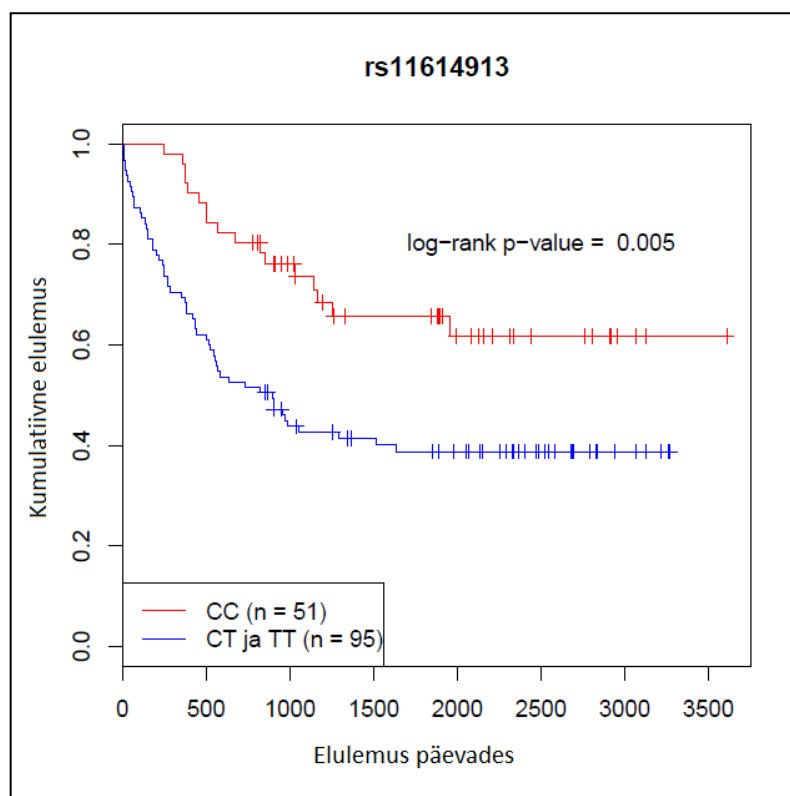
Genotüpiseerimise tulemusel saadud tulemuste järgi oli C alleeli sagedus kontrollidel ligikaudu 0,61 ja T alleel vastavalt 0,39, mis on lähedased dbSNP andmebaasi väärtustega (0,56 ja 0,44) Euroopa populatsioonis. Selle polümorfismi korral ei õnnestunud leida seost kopsuvähi kujunemise riski ja genotüübi vahel. Esmalt uuriti olukorda, kus CC genotüüpi vastandati CT ja TT genotüüpidele. Hii-ruut testi P-väärtus 0,36 ei demonstreerinud seost. Ka

riskide suhe ei viidanud olulisele seosele. Riskide suhe oli 1,17 ja 95% usalduspiiride kaasamisel selgus, et riskide suhte väärtus jääb suure tõenäosusega vahemikku (0,84–1,63), kus on ka väärtus 1, mis demonstreerib seose puudumist (joonis 2). Ka TT vastandamisel CT ja CC genotüüpidele ei esinenud statistiliselt olulist seost ( $P=0,21$ ). Eksperimendi tulemust toetavad ka varasemad meta-analüüsid, mis kirjeldasid seost Aasias, kuid mitte Euroopa populatsioonis (Tian et al., 2010; Wang et al., 2012; Srivastava & Srivastava, 2012).

Elulemuse analüüs andis aga küllaltki tugeva seose, mis annab põhjust eeldada, et Eesti populatsioonis võib kehvema prognoosiga seostada T alleeli kandjaid. Siin on seos nii kolme erineva genotüübi võrdluses kui ka analüüsis, kus CC genotüübi kandjaid võrreldi CT ja TT kandjatega ( $P=0,005$ ). Varasematest uurimustest on leitud vastukäivaid tulemusi. Hiina populatsioonis on kehvem elulemus seotud CC genotüübiga (Hu et al., 2008), aga USA-s läbi viidud uurimusest selgus, et TT genotüübiga patsiendid elasid keskmiselt lühema aja (Christensen et al., 2010). Võimalik, et selline tulemus tuleneb asjaolust, et USA valimis on rohkem Euroopa päritolu indiviide. Sellised tulemused omakorda viitavad asjaolule, et mingil põhjusel käitub polümorfism erinevates populatsioonides täiesti erinevalt.



**Joonis 6. miRNA 196a-2 SNP rs11614913 mõjutab elulemust.** TT (must) ja CT (sinine) genotüübi kandjatel on kehvem prognoos elulemusele võrreldes CC genotüübi kandjatega.



**Joonis 7. SNP-i rs11614913 CC alleeli seos elulemusega.** SNP-i rs 11614913 CC genotüübi kandjatel (punane) on parem elulemuse prognoos võrreldes teiste alternatiivsete genotüüpidega (sinine).

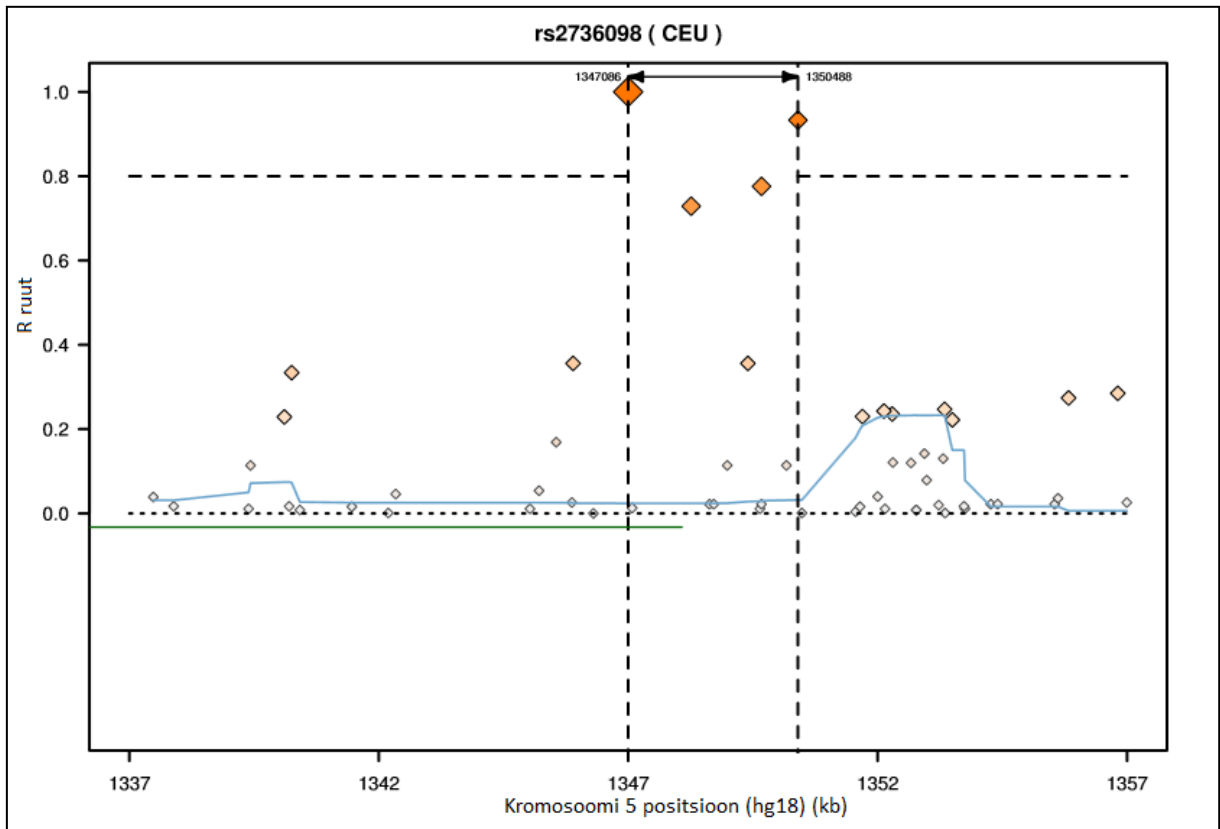
### 2.3.3 *TERT* geenis asuvad SNPd rs2736098 ja rs2736100

SNP-i rs2736098 T sageduseks valimis oli 0,23. Euroopa populatsioonis on vastav sagedus dbSNP andmebaasi andmetel 0,21. Rs2736100 sagedused valimis olid peaaegu identsed dbSNP-i andmetega (C alleeli sagedus oli vastavalt 0,47 ja 0,48). Need kaks SNP-i andsid sarnaseid tulemusi ja asuvad teineteisele lähedal, kuid omavaheline aheldus puudub praktiliselt täielikult ja seetõttu vaadeldi kahte polümorfismi eraldi. Aheldust hinnati veebitööriista SNAP (<http://www.broadinstitute.org/mpg/snap/>) abil (Joonis 8 ja Joonis 9)

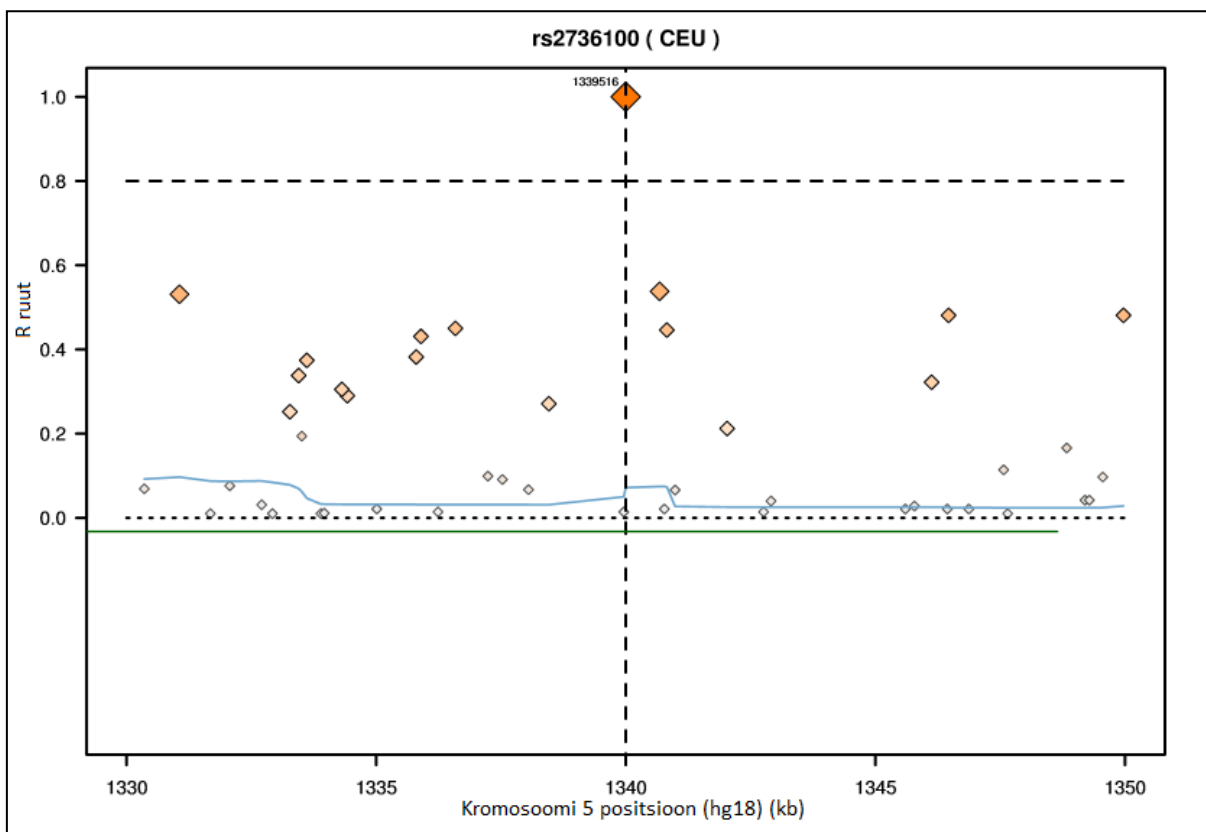
Seost kopsuvähi riski ja antud SNP-de vahel ei leitud. Hii-ruut testi P-väärtused ületasid statistilise olulisuse piiri. Rs2736098 P-väärtus oli CC võrdlusel CT ja TT genotüüpidega 0,22 ja ka riskide suhe ei viidanud seosele (0,81; 95% usaldusintervallidega 0,59–1,13). TT genotüübi võrdlust teiste genotüübi kandjatega võrdlema ei hakatud, sest TT genotüübi sagedus oli küllaltki madal, ligikaudu 0,4%. Ka rs2736100 korral ei olnud olukord kuigi erinev ( $P=0,40$  ja OR on 0,86; usaldusintervallidega 0,60–1,22) (Tabel 2).

Eelnevalt on välja pakutud, et polümorfismi rs2736098 GG genotüüp võiks omada kaitsvat efekti kopsuvähi tekkele (Zhang et al., 2013), kuid sellist tulemust pole alati leitud (Hofer et

al., 2012). Ka selle SNP-i puhul on leitud, et seost vähiga võib leida pigem Aasia populatsioonis (Zhang et al., 2012; Qi et al., 2012). Polümorfism rs2736100 korral on leitud seoseid, et GG genotüüpi esineb rohkem patsientidel (Lan et al., 2013; Terry et al., 2012), Austrias läbi viidud uurimuses aga seost ei leitud (Hofer et al., 2012).

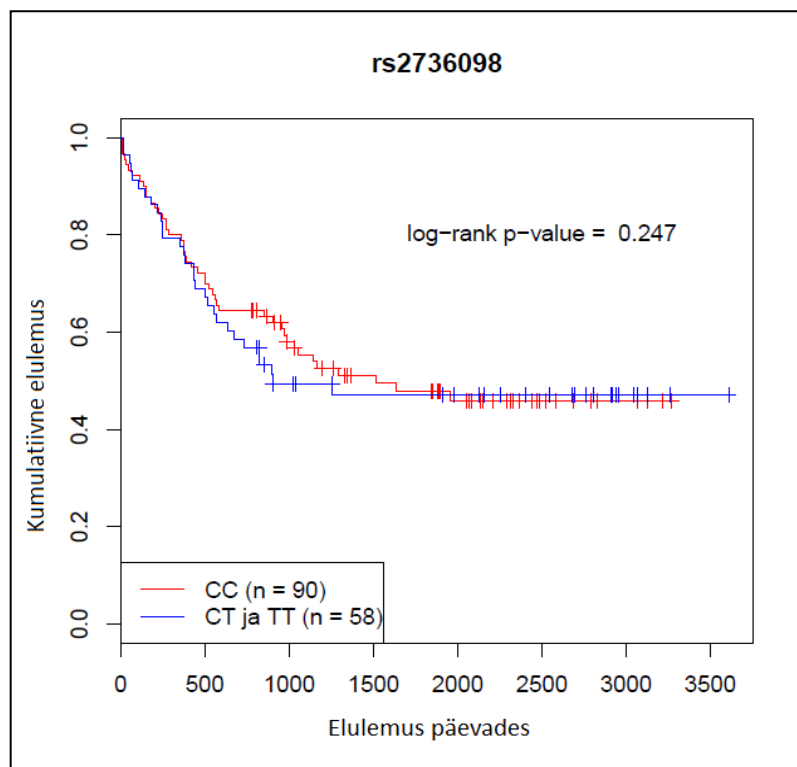


**Joonis 8. Polümorfismi rs2736098 ahelduse graafik.** Joonisel on distant si limiidiks valitud 10 kiloaluspaari ja  $R^2$  künniseks 0,8. Selle läve ületas ainult üks polümorfism, aga positsiooniga, kus asub rs2736100, aheldust ei ole.

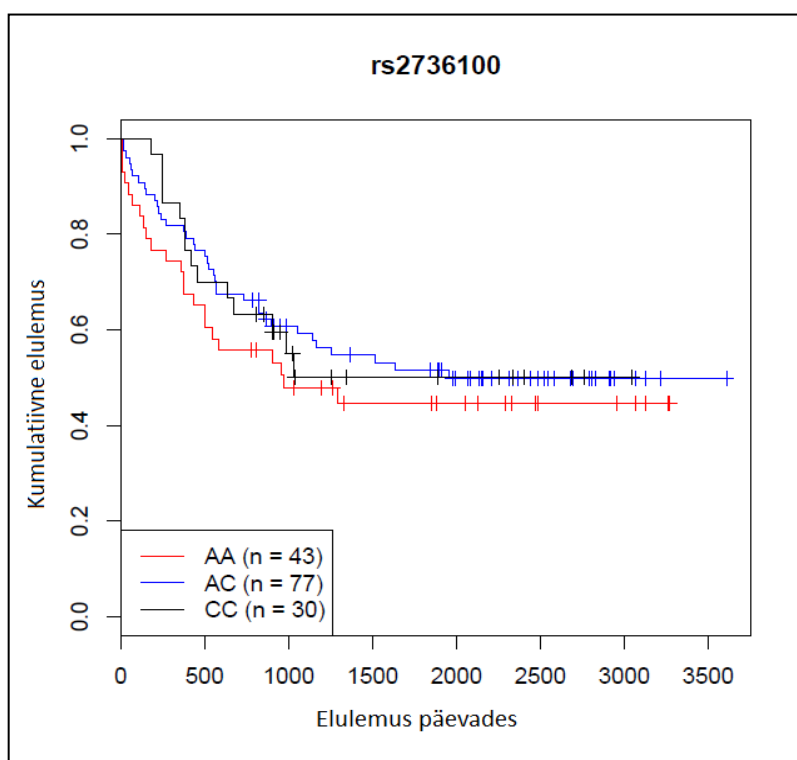


**Joonis 9. SNP-i rs2736100 ahelduse graafik.** Joonise koostamisel oli kasutatud samu parameetreid nagu eelmisel (distanti limiit 10 kiloaluspaari ja  $R^2$  piir 0,8). Jooniselt on näha, et selle polümorfismiga ei ole teisi teised SNP-d aheldunud nii olulisel määral, et ületaks  $R^2$  künnise.

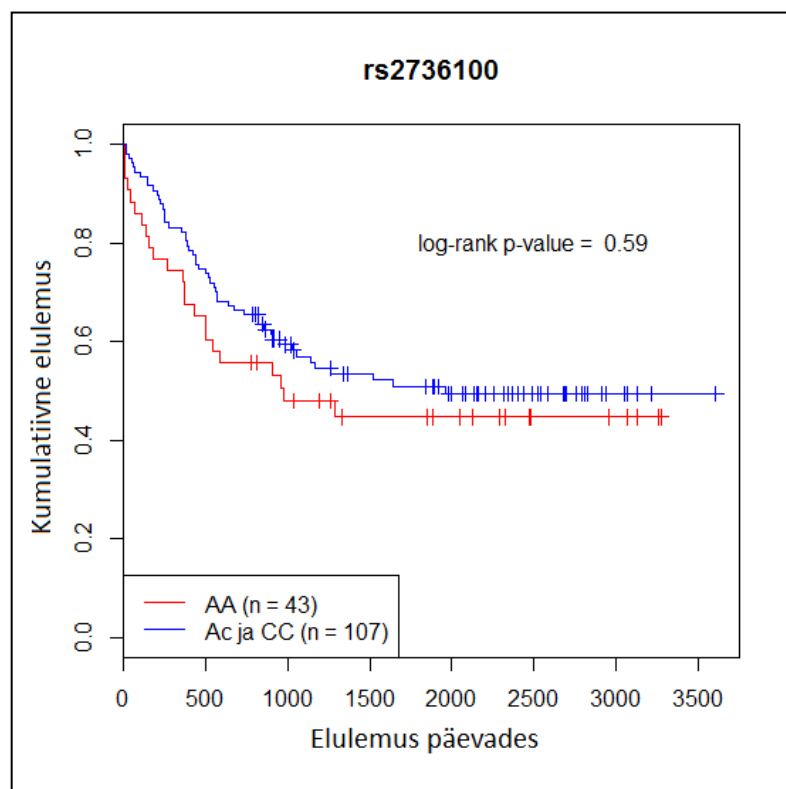
Ka elulemuse analüüsist ei selgunud, et genotüüp võiks mingil moel mõjutada patsiendi prognoosi (Joonised 10, 11 ja 12). Joonised pigem julgustavad väitma, et seos puudub täielikult. Artikleid varasemate elulemusuurimuste kohta ei õnnestunud leida. Võimalik, et seda pole veel eriti uuritud või pole seose puudumise korral tulemusi avaldatud.



**Joonis 10. Rs2736098 ja elulemus.** *TERT* geeni polümorfismi rs2736098 ja elulemuse vahel seos puudub.



**Joonis 11. Rs2736100 mõju elulemusele puudub.** Ükski genotüüp ei tungi esile erineva elulemuse prognoosiga.



**Joonis 12. Rs2736100 ei ole seotud elulemusega.** Polümorfismi rs2736100 ja elulemuse vahel seos puudub.

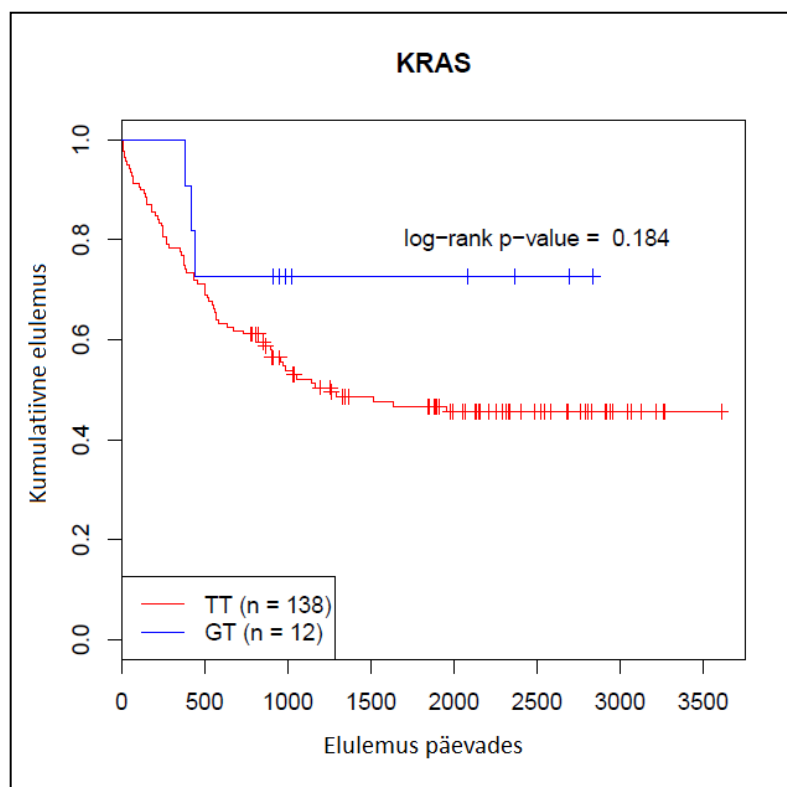
#### 2.3.4 *KRAS* geeni let-7 seondumissaidis asuval SNP-l rs61764370 on nõrk seos kopsuvähki haigestumise riskiga

Rs6176370, *KRAS* geeni 3'UTRis let-7 seondumissaidis asuv SNP, annab põhjuse oletada, et polümorfism mõjutab kopsuvähi kujunemise riski miRNA *let-7* seondumist häirides. Hii-ruut testi rakendamisel TT genotüübi vastandamisel GT ja GG genotüüpidele oli P-väärtus 0,04 ja riskide analüüsi väärtus 0,56, mille 95% usaldusintervallid on 0,32 ja 0,98. G ja T alleelide esinemise võrdlusel kontroll- ja patsientide grupis oli P-väärtus 0,03 ja riskide suhe oli 1,81 koos usaldusintervallidega 1,05 ja 3,16. Selle järgi on kontrollide seas rohkem G alleeli kandjaid ja sellel võiks olla kaitsev efekt. GG genotüüpi TG ja TT-ga ei vastandatud, sest G alleeli sagedus on väike ning patsientide seas sellist genotüüpi ei esinenud (joonis 2)

Elulemuse analüüs ei näidanud statistiliselt olulist seost, log-rank testi P-väärtus oli 0,184, kuid ometi on joonisel märgata, et G alleeli kandjate elulemus kipub olema lühem.

Analüüsi raskendab asjaolu, et G alleel on madala sagedusega (ligikaudu 5,5%) ja seega võivad tulemused nii väikese valimi korral olla kallutatud ja seega tuleks neid tulemusi kindlasti kontrollida suuremas valimis. Hii-ruut testi P-väärtus näitab antud andmete põhjal

statistilist olulisust, kuid enne suurema valimi peal testimist ei võiks julgelt väita, et G alleelil on kaitsev efekt. Valepositiivsuse ohu tõttu võib saadud tulemus peegeldada olukorda, mis jääb usalduspiiridest välja jääva 5% sekka. Samuti on see vastuolus varem avaldatud tulemustega, mis on täheldatud vähi riski seost hoopis minoorse G alleeliga.



**Joonis 13. Rs61764370 ja elulemuse vahel statistiliselt oluline seos puudub.** Kuigi jooniselt on näha et, G alleeli kandajatel võib olla parem prognoos elulemusele, statistiliselt olulist seost KRAS SNP-i rs61764370 ja elulemuse vahel ei ole.



## Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida nelja funktsionaalse kandidaat-polümorfismi mõju kopsuvähi kujunemise riskile ja elulemusele Eesti kopsuvähi patsientide hulgas. Selleks viidi läbi juht-kontroll uurimus, kus patsiente oli valimis 211 ja kontrollindiviide 408. Kopsukliinikus kogutud valimist osalesid uurimuses mitte-väikerakulise kopsuvähi patsiendid. Geenivaramu patsientide valimi puhul oli kriteeriumiks ICD10 kood C34, mis kahjuks ei võimalda alatüübi defineerimist. Lähtudes väikerakulise kopsuvähi suhteliselt madalast sagedusest (10-15% kõikidest kopsuvähkidest) ja halvast prognoosist, võime oletada, et enamus Geenivaramu kopsuvähi diagnoosiga patsientidest põdesid samuti mitte-väikerakulist kopsuvähki.

Analüüsi tulemusel selgus, et neljast valitud polümorfismist oli kopsuvähi kujunemise riskiga statistiliselt seotud *KRAS* geenis asuv SNP rs61764370. Selgus, et G alleelil võib olla kaitsev efekt vähi kujunemise vastu. Veel leiti, et *miR-196a-2* prekursor järjestuses esinev polümorfism rs11614913 mõjutab patsientide operatsiooni järgset elulemust. CC genotüübi kandjatel oli märgatavalt parem prognoos elulemusele, võrreldes teiste genotüüpide kandjatega. Polümorfism rs11614913 võiks olla markeriks hindamaks elulemust.

Edasi tuleks kontrollida saadud tulemusi suuremas valimis. Näiteks ei uuritud käesolevas töös valimi väiksuse tõttu eraldi erinevaid mitte-väikerakulise kopsuvähi histoloogilisi alatüüpe. Eriti oluline on see *KRAS*-is asuva polümorfismi puhul, sest G alleeli sagedus on madal ja see võib väikese valimi korral vähendada statistilist võimsust. MikroRNA *miR-196a-2* polümorfismi võiks testida ka teistes Euroopa populatsioonides, et välja selgitada, kas SNP võiks olla Euroopa populatsioonis elulemuse hindamise markeriks. Huvitav oleks ka uurida, miks rs11614913 mõjub Euroopa ja Aasia populatsioonides erinevalt.

## Summary

### Effects of polymorphisms in *mir-196a-2*, *KRAS* and *TERT* genes on cancer susceptibility and survival.

Klaarika Kikas

Lung cancer was the most commonly diagnosed cancer as well as the leading cause of cancer death in males globally in 2008. Studies suggest that histologically apparent lung cancer is due to the sequential accumulation of specific genetic and morphologic changes to the normal epithelial cells of the lung. Changes in telomerase can affect life cycle and the number of divisions of cell. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) that may influence cancer susceptibility, have been found in telomerase reverse transcriptase (*TERT*) genes. Also microRNAs (miRNA-s), small noncoding RNA molecules that regulate gene expression, may play important role in cancer tumorigenesis and survival.

Current Bachelor Thesis studied four functional candidate-polymorphisms and their influence on lung cancer susceptibility and survival among Estonian lung cancer patients. In order to do that a case-control study was performed, with 211 non-small cell lung cancer patients and 408 healthy controls. Patient blood samples were collected from Tartu University Pulmonary Clinic and DNA samples from Estonian Genome Center.

The results of case-control study indicated that there might be a connection between lung cancer susceptibility and SNP rs61764370 in miRNA *let-7* binding site in the 3'-UTR of *KRAS* gene. It occurred that G-allele may have protective influence (p-value 0,04) against the development of lung cancer. From survival analysis (Kaplan-Meier and log-rank p-value) it was found that polymorphism rs11614913 in miRNA *196a-2* precursor sequence affects survival. Patients with CC genotype had a better prognosis (p-value 0,005) of survival. Polymorphism rs11614913 may be a marker to evaluate survival of patients. No associations between lung cancer and *TERT* gene polymorphisms rs236098 and rs2736100 were found.

In conclusion single nucleotide polymorphisms can affect lung cancer susceptibility and patient survival. In the future there is possibility that some SNP-s may be used as markers to evaluate cancer risk and patient survival.

## **Tänuavaldused**

Soovin tänada dr. Tõnu Vooder'it, kes kogus patsientide koeproovid ning kliinilised andmed, Toomas Hallerit ja Mari-Liis Tammesood, kes abistasid sobivate indiviidide valimisel Geenivaramu doonorite hulgast ning Pauline Ng'd, kes võimaldas kasutada avaldamata andmeid. Veel soovin tänada Tiit Nikopensiust abi eest tulemuste esialgsel analüüsil ning Kristjan Välku, kes oli osadest vereproovidest DNA eelnevalt eraldanud ja toredaid ning abivalmis laborikaaslasid. Eriti soovin tänada oma juhendajaid Tarmo Annilot ja Urmo Võsa suurepärase juhendamise eest.

## Kasutatud kirjandus

- Andrew Fire\*, SiQun Xu\*, Mary K. Montgomery\*, Steven A. Kostas\*†, S. E. D. C. C. M. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(February), 806–811.
- Bellido, F., Guinó, E., Jagmohan-Changur, S., Seguí, N., Pineda, M., Navarro, M., Lázaro, C., et al. (2012). Genetic variant in the telomerase gene modifies cancer risk in Lynch syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*, (September 2012), 511–516. doi:10.1038/ejhg.2012.204
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), 1097–101. doi:10.1038/nsmb1167
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113(1), 25–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12679032>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–9. doi:10.1073/pnas.242606799
- Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Iorio, M. V, et al. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 353(17), 1793–801. doi:10.1056/NEJMoa050995
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2999–3004. doi:10.1073/pnas.0307323101
- Cerne, J.-Z., Stegel, V., Gersak, K., & Novakovic, S. (2012). KRAS rs61764370 is associated with HER2-overexpressed and poorly-differentiated breast cancer in hormone

- replacement therapy users: a case control study. *BMC cancer*, 12(1), 105.  
doi:10.1186/1471-2407-12-105
- Chan, J. A., Krichevsky, A. M., & Kosik, K. S. (2005). MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human. *Cancer research*, 65(14), 6029–6033.
- Chin, L. J., Ratner, E., Leng, S., Zhai, R., Nallur, S., Babar, I., Muller, R.-U., et al. (2008a). A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer research*, 68(20), 8535–40.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2129
- Chin, L. J., Ratner, E., Leng, S., Zhai, R., Nallur, S., Babar, I., Muller, R.-U., et al. (2008b). A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer research*, 68(20), 8535–40.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2129
- Christensen, B. C., Avissar-Whiting, M., Ouellet, L. G., Butler, R. a, Nelson, H. H., McClean, M. D., Marsit, C. J., et al. (2010). Mature microRNA sequence polymorphism in MIR196A2 is associated with risk and prognosis of head and neck cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(14), 3713–20. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0657
- Chu, C., & Rana, T. M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS biology*, 4(7), e210.  
doi:10.1371/journal.pbio.0040210
- Clague J, Lippman SM, Yang H, Hildebrandt MA, Ye Y, Lee JJ, W. X. (2009). Genetic variation in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. *Molecular Carcinogene*, 49(2), 183–189.
- De Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(4), 323–9. doi:10.1038/nrm1359
- De Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*, 19(18), 2100–10. doi:10.1101/gad.1346005
- Duursma, A. M., & Agami, R. (2003). Ras interference as cancer therapy. *Seminars in Cancer*

*Biology*, 13(4), 267–273. doi:10.1016/S1044-579X(03)00040-3

Elbashir, S. M. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*, 15(2), 188–200. doi:10.1101/gad.862301

Ellis, C. A., & Clark, G. (2000). The importance of being K-Ras. *Cellular Signaling*, 12, 425–434.

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), 293–6. doi:10.1038/35005107

Hofer, P., Baierl, A., Bernhart, K., Leeb, G., Mach, K., Micksche, M., & Gsur, A. (2012). Association of genetic variants of human telomerase with colorectal polyps and colorectal cancer risk. *Molecular carcinogenesis*, 51, E176–82. doi:10.1002/mc.21911

Hoffman, A. E., Zheng, T., Yi, C., Leaderer, D., Weidhaas, J., Slack, F., Zhang, Y., et al. (2009). microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer research*, 69(14), 5970–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0236

Hu, Z., Chen, J., Tian, T., Zhou, X., Gu, H., Xu, L., Zeng, Y., et al. (2008). Genetic variants of miRNA sequences and non – small cell lung cancer survival, 118(7). doi:10.1172/JCI34934.2600

Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., et al. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), 635–47. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014

Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(5), 376–85. doi:10.1038/nrm1644

Kim, V. N., & Nam, J.-W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends in genetics : TIG*, 22(3), 165–73. doi:10.1016/j.tig.2006.01.003

Kinnersley, B., Migliorini, G., Broderick, P., Whiffin, N., Dobbins, S. E., Casey, G., Hopper, J., et al. (2012). The TERT variant rs2736100 is associated with colorectal cancer risk. *British journal of cancer*, 107(6), 1001–8. doi:10.1038/bjc.2012.329

- Lagos-Quintana, M, Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), 853–8. doi:10.1126/science.1064921
- Lagos-Quintana, Mariana, Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB*, 12(9), 735–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296057>
- Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research*, 19(19), 5444. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=328920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lan, Q., Cawthon, R., Gao, Y., Hu, W., Hosgood, H. D., Barone-Adesi, F., Ji, B.-T., et al. (2013). Longer Telomere Length in Peripheral White Blood Cells Is Associated with Risk of Lung Cancer and the rs2736100 (CLPTM1L-TERT) Polymorphism in a Prospective Cohort Study among Women in China. *PloS one*, 8(3), e59230. doi:10.1371/journal.pone.0059230
- Langford, L. a, Piatyszek, M. a, Xu, R., Schold, S. C., Wright, W. E., & Shay, J. W. (1997). Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Human pathology*, 28(4), 416–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9104940>
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), 858–62. doi:10.1126/science.1065062
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–9. doi:10.1038/nature01957
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, 21(17), 4663–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126204&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), 4051–60. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15–20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
- Lingner, J. (1997). Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. *Science*, 276(5312), 561–567. doi:10.1126/science.276.5312.561
- Makarov, V. L., Hirose, Y., & Langmore, J. P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, 88(5), 657–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054505>
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Crams, L. S., Dani, M., Larry, L., Jones, M. D., Meyne, J., et al. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes, 85(September), 6622–6626.
- Nelson, H. H., Christensen, B. C., Plaza, S. L., Wiencke, J. K., Marsit, C. J., & Kelsey, K. T. (2010). KRAS mutation, KRAS-LCS6 polymorphism, and non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 69(1), 51–3. doi:10.1016/j.lungcan.2009.09.008
- Nelson, H. H., Christiani, D. C., Mark, E. J., Wiencke, J. K., Wain, J. C., & Kelsey, K. T. (1999). Implications and prognostic value of K-ras mutation for early-stage lung cancer in women. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(23), 2032–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580029>
- Nugent, C. I., & Lundblad, V. (1998). The telomerase reverse transcriptase : components and regulation. *Genes & development*, 12, 1073–1085.
- Olovnikov, a. M. (1973). A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, 41(1), 181–190. doi:10.1016/0022-5193(73)90198-7
- Poy, M. N., Spranger, M., & Stoffel, M. (2007). microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes, obesity & metabolism*, 9 Suppl 2, 67–73.



doi:10.1111/j.1463-1326.2007.00775.x

Qi, H., Zou, P., Zhao, L., Zhu, J., & Gu, A. (2012). TERT rs2736098 Polymorphism and Cancer Risk : Results of a Meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 3483–3488.

Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R., & Albert, S. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), 1177–95.  
doi:10.1016/j.bbamcr.2007.01.012

Ratner, E., Lu, L., Boeke, M., Barnett, R., Nallur, S., Chin, L. J., Pelletier, C., et al. (2011). A KRAS-variant in Ovarian Cancer Acts as a Genetic Marker of Cancer Risk. *Cancer research*, 70(16), 6509–6515. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0689.A

Ruby, J. G., Jan, C. H., & Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), 83–6. doi:10.1038/nature05983

Ryan, B. M., Robles, A. I., & Harris, C. C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature reviews. Cancer*, 10(6), 389–402.  
doi:10.1038/nrc2867

Saunders, M. a, Liang, H., & Li, W.-H. (2007). Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3300–5. doi:10.1073/pnas.0611347104

Seger, Y. R., García-Cao, M., Piccinin, S., Cunsolo, C. Lo, Doglioni, C., Blasco, M. a, Hannon, G. J., et al. (2002). Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer cell*, 2(5), 401–13. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450795>

Sekido, Y., Fong, K. M., & Minna, J. D. (2003). Molecular genetics of lung cancer. *Annual review of medicine*, 54, 73–87. doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152202

Shay, J W, & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(1), 72–6. doi:10.1038/35036093

Shay, Jerry W. (2003). Telomerase Therapeutics : Telomeres Recognized as a DNA Damage Signal : Commentary re : K . Kraemer et al ., Antisense-mediated hTERT inhibition

specifically reduces the growth of human bladder cancer cells . Clin . Cancer Res ., 9 : 3794 – 3800 , 2003 . .

Shay, Jerry W, & Wright, W. E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 21(6), 349–353. doi:10.1016/j.semcancer.2011.10.001.Role

Srivastava, K., & Srivastava, A. (2012). Comprehensive Review of Genetic Association Studies and Meta-Analyses on miRNA Polymorphisms and Cancer Risk. *PloS one*, 7(11), 1–13. doi:10.1371/journal.pone.

Zhang, C., Tian, Y.-P., Wang, Y., Guo, F.-H., Qin, J.-F., & Ni, H. (2013). hTERT rs2736098 genetic variants and susceptibility of hepatocellular carcinoma in the Chinese population: a case-control study. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 12(1), 74–79. doi:10.1016/S1499-3872(13)60009-0

Zhang, X., Xu, Z., Gong, Y., Tang, C., & Chen, J. (2012). Association of TERT rs2736098 Polymorphism with Cancer Risk : a Meta-analysis Abstract, 13, 4943–4946.

Zou, P., Gu, A., Ji, G., Zhao, L., Zhao, P., & Lu, A. (2012). The TERT rs2736100 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 25 case-control studies. *BMC cancer*, 12(1), 7. doi:10.1186/1471-2407-12-7

Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., et al. (2004). Reduced Expression of the let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival Advances in Brief Reduced Expression of the let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer research*, 64, 3753–3756.

Terry, K. L., Tworoger, S. S., Vitonis, A. F., Wong, J., Titus-Ernstoff, L., De Vivo, I., & Cramer, D. W. (2012). Telomere length and genetic variation in telomere maintenance genes in relation to ovarian cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 21(3), 504–12. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0867

The International HapMap Consortium. (2009). A second generation human haplotype map of over 3 . 1 million SNPs. *Nature*, 449(7164), 851–861. doi:10.1038/nature06258.A

- Tian, T., Shu, Y., Chen, J., Hu, Z., Xu, L., Jin, G., Liang, J., et al. (2009). A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(4), 1183–7. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0814
- Tian, T., Xu, Y., Dai, J., Wu, J., Shen, H., & Hu, Z. (2010). Functional polymorphisms in two pre-microRNAs and cancer risk: a meta-analysis. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 1(4), 358–66. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3076781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wang, F., Ma, Y.-L., Zhang, P., Yang, J.-J., Chen, H.-Q., Liu, Z.-H., Peng, J.-Y., et al. (2012). A genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased cancer risk: a meta-analysis. *Molecular biology reports*, 39(1), 269–75. doi:10.1007/s11033-011-0735-0
- Verdun, R. E., & Karlseder, J. (2007). Replication and protection of telomeres. *Nature*, 447(7147), 924–31. doi:10.1038/nature05976
- Wiemer, E. a C. (2007). The role of microRNAs in cancer: no small matter. *European journal of cancer*, 43(10), 1529–44. doi:10.1016/j.ejca.2007.04.002
- Wittinghofer, A., & Nassar, N. (1996). How ras-related proteins talk to their effectors. *Cell*, 21(12), 488–491.
- Von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 339–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114022>
- Wu, M., Jolicoeur, N., Li, Z., Zhang, L., Fortin, Y., L'Abbe, D., Yu, Z., et al. (2008). Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis*, 29(9), 1710–6. doi:10.1093/carcin/bgn073
- Yang, H., Dinney, C. P., Ye, Y., Zhu, Y., Grossman, H. B., & Wu, X. (2008). Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer research*, 68(7), 2530–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5991
- Ye, Y., Wang, K. K., Gu, J., Yang, H., Lin, J., Ajani, J. a, & Wu, X. (2008). Genetic

variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 1(6), 460–9. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-08-0135

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24), 3011–6. doi:10.1101/gad.1158803

## **Kasutatud veebiaadressid**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

<http://vassarstats.net/>

<http://www.broadinstitute.org/mpg/snap/>

<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>

## Lisad

### Lahused:

A-lüüsipuhver (pH 7,3–7,4) Erütrotsuutide välja pesemiseks

155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$

10 mM  $\text{KHCO}_3$

1 mM EDTA

TKM-1 soolapuhver Lümfotsüütide lõhkumiseks

10 mM tris-HCl pH 7,6

10 mM KCl

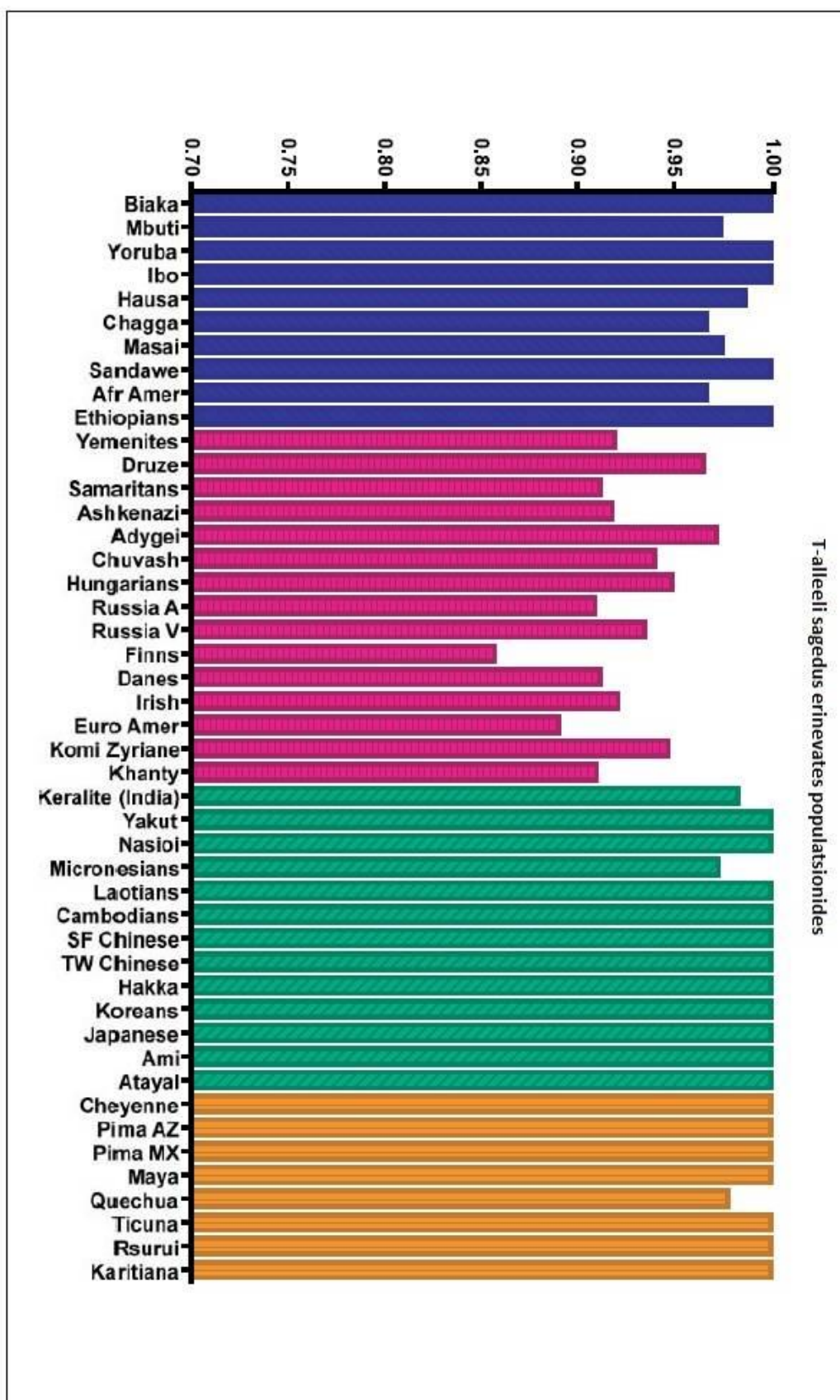
10 mM  $\text{MgCl}_2$

2 mM EDTA

TKM-2 solalahus Tuumamembraani läbiv

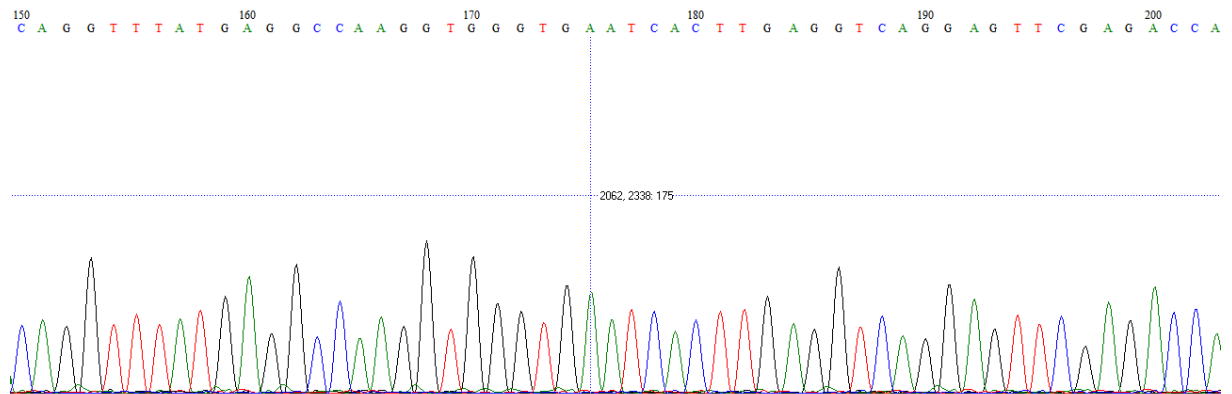
25 ml 5 M NaCl (0,625 M)

TKM-1 kuni 200 ml-ni

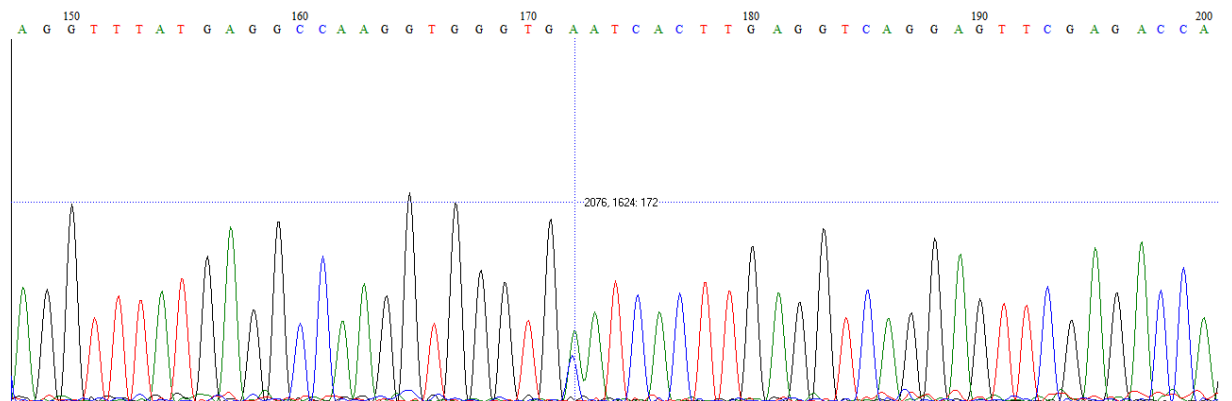


**Joonis 14.** *KRAS* geeni polümorfismi rs61764379 T-alleelide sagedus erinevates populatsioonides. Geograafilise jaotuse järgi on Aafrika populatsioonid märgitud sinisega; Euroopa, Edela-Aasia ja Lääne-Siber on roosa; Lõuna-, Kesk- ja Ida-Aasia koos Vaike Ookeani piirkonnaga on roheline ja oranž tähistab Ameerikat (Chin et al., 2008)

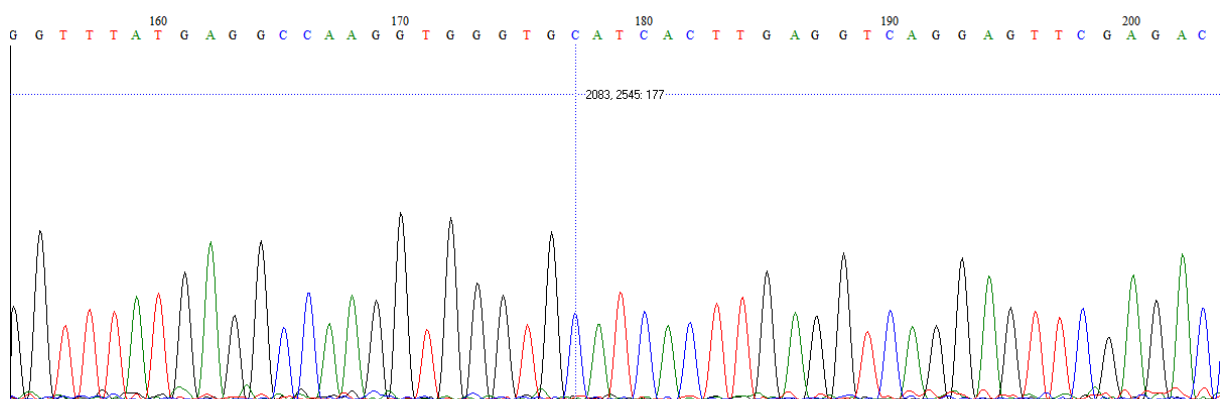
A)



B)



C)



**Joonis 15. *KRAS* geenis asuva SNP-i genotüpiseerimistulemuste valideerimine sekveneermise teel.** Polümorfne positsioon on märgitud vertikaalse joonega. Paneelil A on kujutatud fragment homosügootse A-alleeli (vastasahelal T) kandja DNA järjestusest, paneelil B on heterosügoot C-ja A-alleelid (vastasahelal G ja T) ning paneelil C on C-alleeli homosügoot (vastasahelal G).



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Klaarika Kikas (29.11.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
Ühenukleotiidsete polümorfismide seos kopsuvähi riski ja patsientide elulemusega *mir-196a-2*, *KRAS* ja *TERT* geeni näitel, mille juhendajad on Tarmo Annilo ja Urmo Võsa.
  - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013